

特許協力条約

PCT

E.P

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 TP-97060	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/00370	国際出願日 (日.月.年) 29.01.98	優先日 (日.月.年) 29.01.97
出願人(氏名又は名称) 東レ株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。
3. この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - この国際出願と共に提出されたもの
 - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである. なし
 - 出願人は図を示さなかった。
 - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DERWENT), WPI(DERWENT), GenBank/EMBL(geneseq)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.) 20.8月.1992(20.08.92) & AU, 9214385, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.) 26.1月.1995(26.01. 95) (ファミリーなし)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	JP, 6-87899, A (学校法人藤田学園) 29.3月.1994 (29.03.94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 13(1982) J. W. Ellison et al; "The nucleotide sequence of a human immunoglobulinC ₁ gene" p. 4071-4079	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.98

国際調査報告の発送日

16.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B 9452



電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al. ; "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p. 671-679	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al. : "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p. 1361-1368	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M. C. Szabo et al. ; "Identification of two variants of the human integrin α_4 subunit", p. 1453-1454	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W. S. Argraves et al. ; "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p. 1183-1190	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	U.S. 5 5 1 6 6 3 4, A (Newman P. J.) 14. 5月. 1996 (14. 05. 96) (アミリーなし)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al. ; "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p. 397-407	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al. ; "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integirin subunit $\alpha 2$)", p. 2427-2432	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
X/Y	J.P. 7-500721, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァー シティ オブ カリフォルニア) 26. 1月. 1995 (26. 01. 95) & WO, 92/12236, A 1	39/37-38, 43, 44
X/Y	J.P. 5-505179, A (ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウ ンデーション) 5. 8月. 1993 (05. 08. 93) & WO, 91/09874, A & E.P., 507836, A & U.S., 5169930, A	39/37-38, 43, 44
Y	J.P. 5-502228, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 22. 4月. 1993 (22. 04. 93) & WO, 91/07977, A & E.P., 502124, A & U.S., 5196511, A	26-36, 42

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07K 14/705, C12N 15/12, G01N 33/50		A1	(11) 国際公開番号 WO98/32771
			(43) 国際公開日 1998年7月30日(30.07.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00370			
(22) 国際出願日 1998年1月29日(29.01.98)			
(30) 優先権データ 特願平9/15118 特願平9/234544	1997年1月29日(29.01.97) 1997年8月29日(29.08.97)	JP JP	(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 戒能美枝(KAINOH, Mie)[JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市藤沢633番地1号201 Kanagawa, (JP) 田中利明(TANAKA, Toshiaki)[JP/JP] 〒249 神奈川県逗子市沼間1丁目11番24号 Kanagawa, (JP)			

(54)Title: CHIMERIC PROTEINS, HETERODIMER COMPLEXES THEREOF AND SUBSTITUTE FOR PLATELET

(54)発明の名称 キメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、および血小板代替物

(57) Abstract

Integrin-immunoglobulin chimeric protein heterodimer complexes in which the α -chain and β -chain of integrins have been associated in a stable state. These complexes are not only usable as drugs as such but also applicable to the assaying of binding of integrins to ligands and the detection of substances binding to integrins or those inhibiting binding of integrins to ligands. These complexes are also usable as diagnostic agents. It has been found that integrins isolated in a stably associated structure would bind to extracellular matrixes under physiological conditions in the presence of plasma components, which indicates that integrins and, in its turn, extracellular matrix receptors might be usable as substitutes for platelets.

(57) 要約

本発明は、インテグリンの α 鎖と β 鎖とが安定に会合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を提供する。得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として利用可能であるばかりでなく、インテグリンとリガンドの結合の測定、インテグリンに結合する物質やインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質の探索に利用できる。さらには診断薬にも利用できる。

さらに、構造を安定に会合させて単離したインテグリンが、生理条件下および血漿成分存在下で細胞外マトリックスに結合することを見出した。これによりインテグリン、ひいては細胞外マトリックスレセプターの血小板代替物としての用途を見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スウェーデン
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TG	チャード
AU	オーストラリア	GB	英國	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア・ビサオ	ML	マリーラ共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	GR	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
BR	ブラジル	ID	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CA	カナダ	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴースラヴィア
CF	中央アフリカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴー共和国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CI	コートジボアール	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CN	中国	KR	韓国	RU	ロシア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	SDE	スードン		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SG	スウェーデン		
DE	チエシコ	LI	セリビンシュタイン	SI	シンガポール		
DK	ドイツ	LK	スリランカ	SK	スロバキア		
DEES	デンマーク	LR	スリベリア	SL	シエラ・レオーネ		
	エストニア	LS	レソト				

明細書

キメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、および血小板代替物

技術分野

本発明は、インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、その製造方法、その医薬および試薬としての用途等に関する。さらに、本発明はインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をはじめとする、単離した細胞外マトリックスレセプターの血小板代替物としての医薬用途に関する。

背景技術

種々の細胞は細胞と細胞の間の接着を媒介するレセプターや細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介するレセプターを有し、それらのレセプターが免疫・炎症反応、発生、形態形成、創傷治癒、止血、癌転移などに重要な役割を果たしている。これらの現象に関与するレセプターを分離、同定した結果、いわゆる細胞接着分子の存在が明らかにされた。次々と同定される分子の多くは、その構造的特徴から、インテグリンスーパーファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチンファミリー、カドヘリンファミリーなどに分類されている (Corlos, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994))。これらのファミリーのうち、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチンファミリー、カドヘリンファミリーが、主に細胞間の接着を媒介するのに対し、インテグリンスーパーファミリーは、ファイプロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスへの接着を媒介する、いわゆる細胞外マトリックスレセプターである。この他に、いずれの接着分子のファミリーにも属さない細胞外マトリックスレセプターとして、CD26 (DPPIV)、CD44、GPIV、GPVI、GPIb-vWFなどがあげられる。CD26はコラーゲン、CD44はヒアルロン酸、フィプロネクチンやコラーゲンのレセプターである (「接着分子」p32-42、宮坂昌之 (1991) メジカルビュー社)。また血小板上に存在する膜糖蛋白質 (GP) のうち、GPIV、GPVI、GPIb-vWFなども、コラーゲンレセプターであることが報告されている (「血小板受容体」p119-132、

大熊稔ら (1992) 金芳堂)。

インテグリンスーパーファミリーに属するレセプターは、互いに異なる膜蛋白質である α 鎖と β 鎖の 2 つのサブユニットが非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造を持つ (Hynes, R. O. Cell 48, 549-554 (1987))。当初、インテグリンスーパーファミリーに属する分子は、共有する β 鎖の種類により β 1 インテグリン、 β 2 インテグリン、 β 3 インテグリンの 3 つのサブファミリーに分類されていたが、その後新しい β 鎖、 α 鎖が次々と見つかり、現在では 8 種類の β 鎖 (β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、 β 8)、15 種類の α 鎖 (α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α IIb、 α E) が同定されている (Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996))。それぞれの β 鎖は 1 種から 8 種の α 鎖と会合することが知られており、その結果 21 種類の α 鎖と β 鎖のペアすなわちインテグリン分子が今までに同定されている (Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996))。この中には、医薬品開発のターゲットとなっている α 4 β 1 (VLA-4、 β 1 インテグリン)、 α L β 2 (LFA-1、 β 2 インテグリン)、 α M β 2 (Mac-1、 β 2 インテグリン)、 α IIb β 3 (GP IIb/IIIa、 β 3 インテグリン) などが含まれている (Drug and Market Development 6, 201-205 (1995))。他のインテグリンにも疾患との関連が予想されるものが多い。

インテグリンの持つヘテロダイマー複合体構造は、リガンドとの結合において重要な役割を果たしている (Hynes, R. O. Cell 48, 549-554 (1987))。例えば、インテグリン上のリガンド結合部位は α 鎖と β 鎖の両方から構成されると推定されている (Hynes, R. O. Cell 69, 11-25 (1992))。同じ α 鎖を持ち異なる β 鎖と会合しているインテグリン、あるいは同じ β 鎖を持ち異なる α 鎖と会合しているインテグリンの基質特異性がそれぞれ異なる (Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996)) という事実は、この推測を支持している。一方、一部のインテグリンの α 鎖はその分子中に約 180 アミノ酸からなる I ドメインと呼ばれる配列を挿入していることが報告されているが、この I ドメインだけでリガンドに結合しうることを示唆するデータが報告された (Ueda, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10680-10684 (1994))。

しかしながら、 α 鎖のIドメインと元のヘテロダイマー複合体であるインテグリンとはリガンドへの結合の様式が異なっていることも同時に示されている (Kamata, T. and Takada, Y. J. Biol. Chem. 269, 26006-26010 (1994))。またリガンドに対する特異性、親和性などのパラメーターが同一かどうかは明らかにされていない。Iドメインを含まないインテグリン、例えば $\alpha 4 \beta 1$ の場合、部分構造だけでリガンドに結合するという報告はない。

インテグリンをそのヘテロダイマー複合体構造を維持し、従ってリガンド結合能を保持したまま単離・調製することができれば、自然に近い状態でのリガンドへの結合様式を検討するため有用である。さらに、そのまま医薬品として用いることができるだけでなく、組織や血清中のリガンド量を測定するための試薬として利用したり、接着阻害化合物を探索する際の材料とするなどきわめて有用である。しかしながら、インテグリンをその機能を保持したまま単離・調製することは非常に難しいとされている。その理由として、前述のようにインテグリンの α 鎖と β 鎖の会合が非共有結合のみで維持されているため、単離・調製途中でこの結合が容易に解離してしまうことが上げられる。インテグリンが膜蛋白質であるため可溶化の際に界面活性剤などを用いる必要のあることが複合体解離の大きな要因と考えられる。言い換えると、非共有結合によって機能構造が維持されている点がその調製を阻んでいる要因である。

上述のように困難ではあるものの、これまでにインテグリンヘテロダイマー複合体を機能を保ったまま単離・精製した例がいくつか報告されている。 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ の例では、親和性カラムクロマトグラフィーを用いて精製したインテグリンをリポソームに取り込ませることにより、リガンドへの結合が測定できることが示されている (Santoro, S. A. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 217-223 (1988)、Pytela, R. et al. Cell 40, 191-198 (1985)、Pytela, R. et al. Method. Enzymol 144, 475-489 (1987))。別の例では、精製した $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ をプレートに固相化することによりそれらのインテグリンを介する細胞接着を阻害するペプチドを選択できることが示されている (Koivunen, E. et al. J. Biol. Chem. 268, 20205-20210 (1993)、Healy, J. M. et al. Biochemistry 34, 3948-3955 (1995))。さらに別の例では、精製した $\alpha v \beta 3$ または $\alpha 4 \beta 1$ をプレートに固相化することによりリガンドとの結合が

測定できることが示されている (Charo, I. F. et al. J. Cell Biol. 111, 27 95-2800 (1990)、Makarem, R. et al. J. Biol. Chem. 269, 4005-4011 (1994)、Paul Mould, A. et al. J. Biol. Chem. 269, 27224-27230 (1994))。別の例では、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる α IIb β 3 ヘテロダイマー複合体を、複合体特異的な抗体を介してプレートに固相化させることによりリガンドとの結合を測定できることが示されている (Gulino, D. et al. Eur. J. Biochem. 227, 108-115 (1995))。これらの例は、精製したインテグリンの機能を発揮させる際に、そのヘテロダイマー複合体を何らかの担体に結合または内包させる必要があることを示している。担体が必要な理由として、ヘテロダイマー複合体が非共有結合で会合しているため溶液中で解離し、その結果機能的な構造を維持できないと考えられる。最後の例では、複合体特異的な抗体を用いてヘテロダイマー複合体構造を持つ分子のみを選択し、両鎖が解離しない状態で結合を測定する工夫がなされている。

担体を必要としない例として、精製された α 1 β 1 または α 2 β 1 が担体を利用しないでも高濃度の金属イオン依存的なリガンドとの結合を測定できる例が報告されている (Pfaff, M. et al. Eur. J. Biochem. 225, 975-984 (1994))。この場合には精製過程で含まれる界面活性剤がリポソームと類似の役割を果たし担体として働いていると考えられる。さらに別の例として、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる α M β 2 ヘテロダイマー複合体がリガンドに結合することが示されている (Berman, P. W. et al. J. Cell Biochem. 52, 183-195 (1993))。これらの例では、前記のような担体の必要性は示されていないが、ヘテロダイマー複合体分子間の会合は非共有結合のみで維持されている点は改善されていない。

また他の例として α d と免疫グロブリンのキメラ蛋白質が開示されているが (特表平 8 - 5 0 7 9 3 3)、免疫沈降の結果しか示されておらず、リガンドへの結合は調べられていない。また、 β 鎖を同時に免疫グロブリンとのキメラ蛋白質として発現したわけではないので、 α 鎖と β 鎖の間の結合は非共有結合のままである。

以上の事実は、未だかつて、インテグリンの α 鎖 β 鎖を構造的に安定に会合させ機能を維持したまま調製した例がないことを示している。複合体構造が不安定

であることは、その分子の利用を制限するものである。

インテグリンスーパーファミリーに属する分子のうち、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は、長期間活性化したT細胞や血小板などに発現していることが見出された細胞外マトリックスレセプターである。ただし、血小板や線維芽細胞の細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲンのみに結合し、血管内皮細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲン、ラミニンのいずれにも結合することが報告されており (Elices, M. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9906-9910 (1989))、細胞に依存して $\alpha 2 \beta 1$ の機能が異なると推定されている。

病態との関連において、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は創傷治癒や癌転移に重要な役割を果たすことを示唆する報告がある (Schiro, J. A. et al. Cell 67, 403-410 (1991)、Chen, F. et al. J. exp. Med. 173, 1111-1119 (1991)、Chan, B. M. C. et al. Science 251, 1600-1602 (1991))。さらに、出血傾向を呈する患者の血小板機能解析からインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ を介する血小板とコラーゲンの粘着が、止血・血栓形成過程の第一ステップに深くかかわっていることが示された (Nieuwenhuis, H. K. et al. Nature 318, 470-472 (1985))。この様にインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と病態との関連が示唆されてはいるものの、生理的イオン条件下あるいは血漿成分存在下での使用を前提として、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 蛋白質をはじめとする単離した細胞外マトリックスレセプター蛋白質を用いる医薬用途は検討されていなかった。

一方、臨床現場では血液製剤として用いられている血小板の人工的な代替物の必要性が高まっており、種々の試みが報告されているが (医学のあゆみ 179, 406-407 (1996)、臨床血液 37, 1353-1361 (1997))、実用化には至っていない。

発明の開示

本発明は、インテグリンの α 鎖と β 鎖をそれぞれ免疫グロブリンの重鎖または軽鎖と連結させたキメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、その製造方法、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドおよび細胞との結合を試験する方法、その方法を用いて得られるインテグリンに結合する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いるインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質の探索方法および結合を阻

害する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬および試薬としての用途である。さらに、本発明はインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をはじめとする、単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物である。

図面の簡単な説明

図1は $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がV C A M - 1発現細胞に結合すること、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるE D T Aにより阻害されることを示す。

図2は $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がC S - 1ペプチドに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるE D T Aにより阻害されることを示す。

図3は $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とC S - 1ペプチドとの結合が、G P E I L D V P S Tにより阻害され、他のペプチドでは阻害されないことを示す。

図4は $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がコラーゲンに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるE D T Aにより阻害されることを示す。

図5は $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが、血漿存在下でコラーゲンに結合することを示す。

図6は血漿存在下における $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合が、抗インテグリン抗体、陽イオンキレート剤であるE D T Aにより阻害されることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で述べる細胞外マトリックスレセプターとは、細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介するレセプター群の総称である。このレセプター群には、 α 鎖と β 鎖の2つの膜蛋白質が非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造からなるインテグリンスーパーファミリー (Corlos, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)) と、その他のレセプター、例えばCD26 (DDPIV) 、C

D44、GPIV、GPVI、GPIb- α WFなどが含まれる。さらに本発明で述べるインテグリンとは、インテグリンスーパーファミリーに属する分子を指し、このファミリーに属する分子の変異体も含まれるものとする。本発明の α 鎖としては、 α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α IIb、 α Eの15種類が含まれ、中でも α 4、 α 2が好ましいが、特にこれに限定されるものではない。また、 β 鎖としては β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、および β 8の8種類が含まれ、中でも β 1が好ましいが、特にこれに限定されるものではない。また、 α 鎖と β 鎖のペアからなるインテグリン分子としては、Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophtal. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996) に記載の21種類が含まれるが、特にこれに限定されるものではない。

インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの α 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合、蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリン分子が並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの β 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合も蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリンが並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。 α 鎖と β 鎖のいずれの場合にも免疫グロブリンの重鎖と結合したキメラ蛋白質が好ましい。

また α 鎖あるいは β 鎖と結合させる免疫グロブリンのアイソタイプは特に限定されるものではない。IgG、IgM、IgA、IgEのいずれも利用しうるが、IgGを用いることが好ましい。IgGのサブクラスとしては、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄があるが、IgG₁を用いるのが好ましい。さらに免疫グロブリンの代わりに分子間にジスルフィド結合を有するダイマー構造の分子を利用することも可能である。

本発明では、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる分子をインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と呼ぶ。このとき α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫

グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様) と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせが好ましい。より好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせである。

具体的には、本発明のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、 α 鎖が α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α IIb、または α Eであるものが挙げられる。また、 β 鎖としては β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、または β 8であるものが挙げられる。好ましくは α 鎖が α 4または α 2であり、 β 鎖が β 1であるが、特にこれに限定されるものではない。

以下にインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製方法を述べるが、これに限定されるものではない。

インテグリンの α 鎖および β 鎖を暗号化するDNAを得るには、公知のcDNA配列の情報を利用して、PCR法による遺伝子増幅、cDNAクローニング、DNA合成などの方法を利用しうる。例えば α 4および β 1のDNA配列はすでに文献に報告されている (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)、Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987))。インテグリンの α 鎖と β 鎖を暗号化するDNAを得る別の方法として、抗体を利用する発現クローニングなども利用しうる。免疫グロブリンの定常領域を暗号化するDNAと結合するために、インテグリンの α 鎖と β 鎖の細胞外部分のみを暗号化するDNAを取り出すことが望ましい。そのためには、PCR法およびDNA合成法を用いることが好ましい。ここでいう細胞外部分とは、 α 鎖と β 鎖いずれの場合にも膜貫通部分と予想されている部分よりN末端側のポリペプチド配列を指す。リガンドとの結合能が維持されればその部分配列を用いることも可能であるが、細胞外領域と考えられている部分の大部分を用いることが好ましい。DNAを取り出す際には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結した後にフレームがあうように調整を加えておく必要がある。例えば、PCR法によりDNA断片を取り出す場合にはプライマーに変異を加えることによりこれを達成しうる。この場合、プライマーの塩基置換によりアミノ酸変異がおきないように設計することが望ましい。ただしキメラ蛋白質の機能に変化を与えない範囲でのアミノ酸置換は

許容しうる。化学合成によりDNAを得る場合には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結し得るように配列を設計しておくことで目的を達する。cDNAの場合には、DNAの切断と合成DNAを利用して、免疫グロブリンを暗号化するDNAと結合できるDNAを調製しうる。

次に免疫グロブリンを暗号化するDNAを調製する。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖を暗号化するDNAを用いることが望ましいが、他の動物種の免疫グロブリンを暗号化するDNAも利用しうる。ヒトIgGを暗号化するDNAの調製例はすでに報告されているが(Ellison, J. W. et al. Nucl. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982))、これに限定されるものではない。前述のインテグリン α 鎖、 β 鎖を暗号化するDNAの調製と同様の方法を利用してもよい。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖として、ゲノムDNAを用いることが好ましいが、cDNAを用いてもよい。ヒト免疫グロブリン重鎖のDNAとしては、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域を暗号化する部分を用いることが好ましいが、CH1～CH3の定常領域全体を暗号化するDNAを利用してもよい。免疫グロブリン軽鎖の場合にはCL領域を暗号化するDNAを用いる。最終的に α 鎖あるいは β 鎖の細胞外部分を暗号化するDNAとヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域を暗号化するDNAをフレームをあわせて連結する。得られたDNAは翻訳開始のメチオニンに始まって、インテグリンの α 鎖または β 鎖のシグナル配列、その細胞外領域、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域をこの順に連結したポリペプチドを暗号化する。

上記で得られたインテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、あるいはインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、をそれぞれ適当な発現制御配列に機能的に連結し、組み換えベクターを得る。組み換えベクターの作製方法、細胞への導入方法、など一般的な遺伝子組み換えに関する方法は成書に記載されているが("Molecular Cloning" Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。本発明においては、動物細胞での蛋白質発現に適した発現制御配列を用いることが望ましい。例えば、昆虫細胞発現ではポリヘドリンプロモーター、p10プロモーターなどが、その他の動物細胞発現ではSR α プロモーター、サイトメガロウ

イルス由来プロモーター、シミアンウイルス40由来プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、p10プロモーターなどが発現制御配列として一般的に用いられているが、これらに限定されるものではない。本発明においてはSR α プロモーターを用いることが好ましい。

得られた組換えベクターを細胞に導入することにより、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体産生細胞を得る。このとき、動物由来細胞を宿主として用いることが好ましい。たとえば、COS細胞（サル腎臓細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、Sf9（昆虫細胞）などが宿主として一般的に利用されている。また、P3U1やY3などのミエローマ細胞を用いてもよい。その他の株化細胞やクローン化細胞も利用しうるが、これらに限定されるものではない。本発明においては、CHO細胞を用いることが好ましい。

細胞に組み換えベクターを導入する方法としては、リポフェクチン法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などが知られており、いずれの方法を用いててもよい。ただしこれらに限定されるものではない。組み換えベクターを用いて細胞を形質転換する際に、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、およびインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、を薬剤耐性マーカーを変えて順次細胞に導入することが好ましい。導入はどのような順序で行ってもかまわない。また、同時に導入してもよい。導入する2種の組み換えベクターとしては、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様）と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせを発現するベクターがよい。これらのどの組み合わせでもよいが、好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖を発現する組み換えベクターの組み合わせがよい。

いずれの形質転換方法、ベクターの組み合わせによっても、同時に2種の組み換えベクターで形質転換され、しかも α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質を同時にほぼ同量、產生している細胞を選別することが重要である。これは、組み換えベ

クターで形質転換された細胞の培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の産生量を測定することで達成できる。測定方法としては、例えば公知の方法に従って形質転換細胞を 35 Sを含む培地で培養することにより蛋白質をラベル化した後、培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量をそれぞれの抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いる免疫沈降により推定することができる。他の方法としては、抗ヒト免疫グロブリン抗体と抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いるELISA法によって培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量を推定することができる。いずれにしても培養上清中への α 鎖および β 鎖のキメラ蛋白質の産生量がほぼ同量で、多量に産生しているクローンを選別することができる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製のためには好ましい。蛋白質のラベル化方法、免疫沈降の方法、ELISAの一般的な方法は成書に記載されているが("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。またキメラ蛋白質の検出のために他の方法も利用しうる。

得られた形質転換細胞を一般的な細胞培養の方法に従って培養し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生させることができる。培地として、低免疫グロブリン濃度の血清を5%程度含む培地が好ましいが、一般に知られている血清含有培地や無血清培地でもよい。細胞を培養後、遠心分離などの操作により細胞および固形物を除去し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清を回収する。

この培養上清中には α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質と β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質がヘテロダイマー複合体を形成したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質だけでなく、ヘテロダイマー複合体を形成していない α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質が混入していると推定できる。しかし、ヘテロダイマー複合体以外の分子はリガンドへの結合能を持たないことから、この培養上清をリガンドまたは細胞との結合の試験、インテグリ

ンとリガンドの結合を阻害する物質の探索、インテグリンに結合する物質の探索、インテグリンのリガンド量を測定する試薬、として利用することができる。これらの利用方法は、後述する精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いる場合と基本的には同じである。

インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は、免疫グロブリン部分の性質を利用してプロテインAカラム担体を用いる定法に従って達成できる。また、 α 鎖または β 鎖に対する抗体を用いる親和性クロマトグラフィーの手法を利用しててもよい。さらに、リガンドを担体に結合した親和性クロマトグラフィーの手法により精製することもできる。一般的なクロマトグラフィーの方法を組み合わせて精製することもできる。インテグリン分子をこれらの方法で精製した公知例 (Pytela, R. et al. Methods Enzymol. 144, 475-489 (1987)、Santoro, S. A. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 217-223 (1988)、Charo, I. F. et al. J. Cell Biol. 111, 2795-2800 (1990)、Makarem, R. et al. J. Biol. Chem. 269, 4005-4011 (1994)、Pfaff, M. et al. Eur. J. Immunol. 225, 975-984 (1994)、Gulino, D. et al. Eur. J. Biochem. 227, 108-115 (1995)など) を応用すれば、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は達成できる。

精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、SDS-PAGEにより非還元下で少なくとも1本のバンドを示し、還元下で少なくとも2本のバンドを示す蛋白質として同定できる。また、これによりヘテロダイマーが免疫グロブリン重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを確認できる。まれに、還元下で複数のバンドが検出できることがあるが、これは α 鎖の分子内切断が起こっているためと考えられる。特に $\alpha 4$ でこの現象が知られている (Hemler, M. E. et al. J. Biol. Chem. 262, 11478-11485 (1987))。さらに、それぞれのバンドがキメラ蛋白質であることは、ウエスタンブロッティングなどの方法により確認できる。別の方法として、得られた分子がインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることは、前述の抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を組み合わせたELISAにより確認できる。つまりすべての抗体に対するエピトープを持つ蛋白質分子として同定できる。さらに別の方法として、免疫沈降によってインテグリン-免疫

グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を同定することもできる。この場合には、精製した蛋白質を公知の方法を用いて³⁵Sまたは¹²⁵Iまたはビオチンなどでラベル化した後、抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて免疫沈降するといずれの場合にも同じ電気泳動パターンが得られることで、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が目的とする構造をとっていることを確認することができる。さらに、細胞膜上のインテグリン複合体が解離する条件、例えばEDTAの共存や、SDSの存在下での煮沸などの操作を加えても免疫沈降パターンが変化しないことから、得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質が構造的に安定化された複合体であることを確認できる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の確認方法はこれらによって限定されるものではない。

調製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドとの結合は以下のように試験することができる。リガンドとインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を接触させて混合物を作製した後に、リガンドに結合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の量またはインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量の測定は、複合体自身を蛍光色素または酵素またはラジオアイソトープなどで標識しておくことで行うことができる。リガンド量の測定も同様の手法で行うことができる。SPA(アマシャム社)のような検出方法を利用して測定することもできる。さらに、蛍光色素、酵素、ラジオアイソトープなどで標識した複合体またはリガンドを認識する試薬を利用して測定することもできる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、例えば抗ヒト免疫グロブリン抗体がある。本試験においては、検出される分子を何らかの担体、例えばビーズやプレート、に結合させておくことが好ましい。また、リガンドは分子全体だけでなく、インテグリンとの結合活性を保持する一部分を取り出して使用することもできる。例えば、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ またはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ については、そのリガンドであるフィブロネクチンまたはコラーゲンやそのペプチド断片を担体に結合させて使用することができる。

上記と同様の手法を用いて、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と細胞との結合を試験することができる。複合体に結合した細胞量の測定は、細胞を蛍光色素またはラジオアイソトープで標識するか、あるいは細胞と反応する試薬、例えば表面抗原と反応する抗体を利用することで行いうる。細胞の代わりに、組織切片のようなものを用いた場合は、結合するインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量を前記のいずれかの方法により測定することになる。

これまでに述べたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞との結合を調べる方法は、そのままインテグリンとリガンドとの結合を阻害する物質、例えば抗体、ポリペプチド、ペプチド、低分子化合物を取得することに利用できる。好ましくは、被検物とインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をあらかじめ混合したのちに上記の測定系にてインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のリガンドへの結合量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量が、ある被検物質を加えて下がるようであれば、その被検物質に阻害活性があると判断できる。ただしこの系では、金属イオンキレート作用を持つ物質や界面活性作用を持つ物質などが擬陽性の結果をもたらす可能性がある。被検物質のソースとしては、下述のインテグリン結合物質、リガンドのペプチド断片、その誘導体、市販の化合物などを利用するが、この限りではない。

これまでに、精製したインテグリンをプレートに固相化し、結合するペプチドを探索した例が報告されている (Healy, J. M. et al. Biochemistry 34, 3948-3955 (1995))。本発明で得られるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いても、同様にインテグリンに結合する物質を探索することができる。特に、本発明のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いた場合には、非特異的に結合した物質を除去するための操作をより厳しい条件で行いうることから、操作の簡略化がはかられる利点がある。また、操作途中の複合体の解離がないことから、より特異的に結合物質を選択できる利点がある。結合物質を選択するソースに適したものとして、ファージペプチドライブラー (例えば Scott, J. K. and Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990)) や DNA オリゴ

マーのライブラリー（例えばO' Connell, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5883-5887 (1996)）が知られているが、本発明においては前者を用いることが好ましい。

さらに前記のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドあるいは細胞の結合を試験する方法は、体液や組織中でのインテグリンのリガンド量の変化を測定する方法として利用できる。

また、本発明のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は医薬として用いることができる。具体的には、本発明により、インテグリンをはじめとする単離した細胞外マトリックスレセプターが血小板代替物として利用できることが明らかになった。

血小板代替物として用いる細胞外マトリックスレセプターとしてはインテグリンが好ましい。インテグリンの α 鎖としては $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE があげられるが、中でも $\alpha 2$ が好ましい。 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ があげられ、中でも $\beta 1$ が好ましい。より好ましくはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ である。単離するためのレセプターソースとしては、細胞外マトリックスレセプターを発現する組織や細胞、遺伝子組み換え法により作製したレセプター発現細胞の膜分画の溶解物などが利用できる。より好ましくは、遺伝子組み換え法によりレセプター遺伝子に変異を加えて可溶化体となるように設計し、これを產生する細胞の培養上清をソースとして使用する。さらに、可溶化体を設計する上では、細胞外マトリックスレセプターの機能的な構造が維持されるようにすることが好ましい。例えば、インテグリンのヘテロダイマー構造を、 α 鎖と β 鎖を共有結合などにより会合できるように改変したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いることが望ましい。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体としては、 α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE であるものが好ましく、中でも $\alpha 2$ であるものが好ましい。また、 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ であるものが好ましく、中でも $\beta 1$ であるものが好ましい。より好ましくは α 鎖が $\alpha 2$ であり、 β 鎖が $\beta 1$ である。

以下、本発明の血小板代替物を細胞外マトリックスレセプターの代表例であるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を中心説明するが、本発明はこれに限定されない。

精製したインテグリン－免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬用途を確認するためには、精製した蛋白質そのものを用いて薬理活性を調べる。より好ましくは、細胞外マトリックスへのより高い結合能を得るために、インテグリン－免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を脂質や蛋白質重合体などからなる担体に結合させて用いるが、これには限定されない。

血小板代替物として用いる場合には、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、既報 (Martin, F. J. et al. Biochemistry, 20, 4229 (1981)) の方法に準じて、リポソームに共有結合させて用いることが好ましい。担体としては、リポソーム以外のどのような薬物担体でも、医薬品用途が容認されるものであればよい。リポソーム担体を用いる場合、成書 (『リポソームの作製と実験法』、奥直人 (1994)、廣川書店) にある組成、方法を用いてリポソームを作製するが、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の細胞外マトリックスへの結合エピトープがリポソーム膜の外側に露出する方法が好ましい。

ここで調製したリポソーム担体上に、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認する方法として、フローサイトメーターを使用する。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体などを利用することができる。利用する抗体が、蛍光標識されている場合はそのまま測定に供するが、蛍光標識されていない場合には、抗体を作製した動物種の免疫グロブリンクラスを認識する2次抗体の蛍光標識体を用いて行う。これ以外の確認方法として、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体自身を酵素またはラジオアイソトープなどで標識し、発色色素や放射活性測定装置などの適切な組合わせによって確認することも可能である。

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを用いて細胞外マトリックス結合能を調べるには、生理的な陽イオン濃

度を含む緩衝液中または血漿中にインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを懸濁して用いることが好ましい。ここで言う生理的な陽イオン濃度を含む緩衝液とは、少なくとも、Mgイオン、Caイオンのような陽イオンを含み、中性付近に調整されたものを言う。また、血漿は、抗凝固剤の存在下で採血し、一般的な血漿作製法にて調製する。たとえば、抗凝固剤としてヘパリンやEDTA溶液を十分な単位数加えて用いることができる。市販されている正常血漿、凝固因子欠乏血漿や血清などを用いてもよい。ただし、使用する抗凝固剤により陽イオン濃度が低下する場合、後に生理的な濃度になるように陽イオンを添加して使用する。次に、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを、担体に固相化した細胞外マトリックスあるいはその一部の断片と一定時間混合して結合の有無を判定する。細胞外マトリックスあるいはその一部の断片の固相化は、プラスチックプレートなどを用いて行うことが好ましいが、市販の細胞外マトリックス固相化ビーズなどを用いててもよい。細胞外マトリックスとして、コラーゲンを用いる場合、どのような動物種およびタイプを用いてもよい。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームと細胞外マトリックスとの結合反応は、血小板の粘着反応をみるのに一般的な方法に準じて行う。多くの場合は、主に静止系で一定時間放置し、マトリックスへの結合を誘導するが、好ましくは、振とう負荷、すり応力などを加える。

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、上述のような条件下で細胞外マトリックスに結合するが、この結合量は、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いる上述のELISA法を応用して測定する。より正確な定量のためには、マトリックスに結合したリポソームを1%グルタルアルデヒドなどにより固定しておくことが望ましい。また、ELISA法以外に、たとえば放射標識した脂質をリポソームにあらかじめとりこませておけば、細胞外マトリックスに結合したリポソーム量を放射活性として求めることもできる。さらに、細胞外マトリックスへの結合および被覆度を定性的に判断するには、結合したリポソーム上のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する標識抗体と発色色素などを組合わせ、リポソームが結合している部分を染色することができる。より好ましくは、一般的に使用さ

れる組織抗体染色の方法を利用し、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンヘテロダイマー複合体に対するペルオキシダーゼ標識抗体とジアミノベンチジンを組合わせるが、この方法に限定されない。他の方法として、細胞外マトリックスを被覆した面積を、画像処理解析装置を用いて被覆率を求めてよい。

血小板の止血機能検査として、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能、コラーゲンにより誘導される凝集能をみる方法がある（「血液凝固検査ハンドブック」p65-78、福武勝博、藤巻道夫（1987）宇宙堂八木書店、S. A. Cell, 46, 913-920 (1986)、Lethagen, S. and Rugarrn, P. Thrombo Haemost, 67, 185-186 (1982)）。特に、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能の高さが、一次止血能の高さの指標となる。この粘着能の評価は、血液をそのまま用いるか、もしくは多血小板血漿や生理イオン条件の緩衝液で洗浄した血小板を用いて行う。従って、本発明で得られたインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが血小板の機能代替物となりうるかどうかは、血漿成分存在下、あるいは生理的なイオン濃度条件下における細胞外マトリックスへの結合性の有無、結合性の高さで判断できる。

本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの血漿成分存在下における細胞外マトリックスへの強い結合性は、血小板代替物となりうることを示している。従って血小板異常による先天性および後天性の出血傾向に対する治療・予防薬として、広くは、血小板輸血代替物として使用できる。

同様にして、本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、血管内皮細胞障害が問題となる病態の治療・予防薬となりうる。例えば、P T C A（経皮的冠血管再狭窄）の予後ににおいては、バルーンカテーテル処理により露出した細胞外マトリックスへの血小板の過剰集積が、再狭窄の引き金となることが報告されている（Liu, M. W. et al. Circulation, 79, 1374-1378 (1989)）。実施例22においてインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの細胞外マトリックス被覆効果が確認されたが、この効果により血小板の過剰集積が軽減され、再狭窄予防薬としても利用しうる。また、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを医薬用途で許容される

方法で標識すれば、血管内皮細胞障害により露出した細胞マトリックス露出部位のモニタリングに利用できるほか、リポソーム内への薬剤封入により、障害部位局部へのターゲッティング療法へも応用できる。

本発明で示されるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ - 免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを血小板代替物として用いる場合の投与経路としては、輸液注入もしくは静脈内投与などが挙げられ、通常、塩溶液または血漿などの生理学的に適合する溶液に懸濁して用いられる。また、単独で用いても、他の細胞外マトリックスレセプターやその免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と組み合わせて用いてもよい。また、全血小板を含む他の薬剤と一緒に用いることもできる。投与量は症状、年齢、体重等に応じて適宜選択されるが、成人に対して、蛋白質量として1日0.1mg～10gであり、1回または数回に分けて投与することができる。また、薬学的に許容される担体、賦形剤などと混合し、軟膏剤、塗布剤、貼付剤などの外用剤として障害部位へ局所的に投与することも可能である。この場合には1回塗布あたり蛋白質量として1ng/cm²～1mg/cm²となるように調製される。

実施例

以下、本発明をより詳しく説明するために実施例をあげる。一般的な組み換えDNA実験の手法は成書の方法 ("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に準じた。

実施例 1

ヒトIgG1重鎖発現ベクターの作製

ヒトIgG1遺伝子は、報告された塩基配列情報 (Ellison, J. W. et al. Nucleic Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)) に基づくハイブリダイゼーションcDNAプローブを用い、ヒトゲノムライブラリー (CLONTECH) から上述の配列情報に一致するクローンを取得した。これをPCRの鑄型DNAとした。ヒトIgG1遺伝子のヒンジ領域 (H) と定常領域部分 (CH2とCH3) を含むDNA断片を增幅するためのプライマーとしてBamH I制限サイトを挿入した配列表の配列番号4 (以下、配列表の配列番号を、配列番号と略す)、Xba I 制限サイトを挿入した配列番号5に示すDNAオリゴマーを合成した。

5' -GCGGATCCCGAGCTGCTGGAAAGCAGGCTCAG-3' (配列番号4)

5' -CCTCTAGACGGCCGTCGCACTCATTTA-3' (配列番号5)

鋳型DNA、プライマー、dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP等モル混合液)、Taqポリメラーゼ (Takara) をPCR緩衝液 (100 mM Tris-HCl、500 mM KCl、15 mM MgCl₂、0.01% gelatin pH8.3) 中で混合したのち、サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus) にて、DNA変性を94℃で1分、プライマーのアニーリングを58℃で2分、プライマーの伸長を72℃で3分を30サイクル行った。増幅したDNAを制限酵素BamH IおよびXba Iで消化後、常法 ("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従い、1%アガロースゲルにてDNA断片を精製した。これを制限酵素BamH IおよびXba Iで消化して精製したpBlue script SK (+) (STRATAGENE) の大DNA断片とT4DNAリガーゼを用いて連結した。このプラスミドDNAを用いて大腸菌 (JM109) を形質転換し、形質転換株を選択してプラスミドDNA (1gG, Blue script)を得た。次に、発現ベクター pcdL-SRα296を制限酵素BamH Iで消化後、T4DNAポリメラーゼ処理にて平滑端とし、Not Iリinkerを連結した。これを、制限酵素Not IおよびXho I消化した大DNA断片と1gG, Blue scriptを制限酵素Not IおよびXho I消化した小DNA断片を常法に従って精製し、両DNA断片をT4DNAリガーゼで連結した。これを大腸菌 (HB101) に形質転換した後に形質転換株を選択してプラスミドDNAを得た。以下、該プラスミド (1gG, SRα) をヒト1gG, 発現ベクターと呼ぶ。なお、以後の実施例で述べる遺伝子組み換えの基本的な操作は上記と同様であるので簡略に述べる。

実施例2

インテグリンα4・1gG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリンα4の細胞外部分を暗号化するDNA断片は、既報のcDNA配列情報 (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)) をもとにクローニングした。配列番号1の1801塩基位の制限サイトEcoR I、112塩基位の制限サイトStu I、2949塩基位の制限サイトBamH Iを連結に利用し、N端翻訳開始点からStu I切断部位をα4-1、Stu IからEcoR I切断部位をα4-2、

EcoR I から BamH I 切断部位を α 4 - 3 とし、これを連結することによって得た。以下に具体的な方法を示す。

α 4 - 1 を暗号化する部分は配列番号 6 ~ 9 の DNA オリゴマーを連結してクローニングする設計とし、配列番号 6 ~ 9 に示す DNA オリゴマーを合成した。配列番号 6、7 には、ベクターへの連結のために N 端を暗号化する側に制限サイト Xba I を付加した。また、既知配列情報と比較して配列番号 1 の 60、63、64 位の塩基を C → T、C → A、C → G に置換、112、114 位の塩基を C → A、C → G に置換した。112、114 位の置換により、配列番号：8、9 の N 端を暗号化する側に制限サイト Stu I を挿入した。合成したオリゴマーの 5' 末端をリン酸化、アニーリングした後、T4 DNA リガーゼを用いて連結した。連結後、制限酵素 Xba I と Stu I で切断し、5% アガロース (NuSieve G T G a g a r o s e、F M C) ゲルにて電気泳動し、目的とする約 120 bp の DNA 断片 (α 4 - 1) を切り出して、精製した。

5' - C T A G A C C A C C A T G T T C C C C A C C G A G A G C G C A T G G C T T G G G A A G C G A G G C G C G A A C C C G G G C C C G G A
G C T G C A - 3' (配列番号 6)

5' - G C T T C G G G G C C C G G G T T C G C G C T C G C T T C C C A A G C C A T G C G C T C T C G G T G G G G A A C A T G G T G G T - 3'
(配列番号 7)

5' - C T C C G G G A G A C G G T G A T G C T G T T G C T G T G C C T G G G G G T C C C G A C C G G C A G G - 3'
(配列番号 8)

5' - C C T G C C G G T C G G G A C C C C C A G G C A C A G G C A A C A G G C A T C A C C G T C T C C C G G A G T C G A - 3'
(配列番号 9)

次に、インテグリン α 4 発現細胞であるヒト骨肉腫細胞株 MG 63 (ATCC C R L 1427) の RNA を分離し、オリゴ d T セルロースカラム (NEB) を用いて Poly A (+) RNA を精製した。これをもとに逆転写酵素 (GIBCO) を用いて 1 本鎖 c DNA を合成し、PCR の録型として使用した。 α 4 - 2、 α 4 - 3 の DNA を增幅するプライマーとして、Pst I、Stu I 制限サイト (配列番号 10)、BamH I 制限サイト (配列番号 13) を挿入した配列番号 10 ~ 13 の 4 本の DNA オリゴマーを合成した。

5' - C A C T G C A G G C A G G C C T T A C A A C G T G G A C A C T G A G A G C - 3' (配列番号 10)

5' - G C A G A A A C C T G T A A A T C A G C A G - 3' (配列番号 11)

5' -GCATTTATGCGGAAAGATGTGC-3'

(配列番号 1 2)

5' -CGGGATCCGTGAAATAACGTTGGGTCTT-3'

(配列番号 1 3)

鋳型cDNAとプライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA変性を94°Cで1分、プライマーのアニーリングを58°Cで2分、プライマーの伸長を72°Cで3分を30サイクル行った。増幅した α 4-2、 α 4-3のDNA断片をそれぞれPst IおよびEcoR I、EcoR IおよびBamH Iで消化後、pBlue script KS (+) (STRATAGENE)にサブクローニングし、プラスミドDNA(以下、 α 4-2Blue script、 α 4-3Blue script)を調製した。次に、 α 4-2Blue scriptの上流に、Xba IおよびStu I制限サイトを利用して α 4-1を連結し、プラスミドDNA(以下、 α 4-1-2Blue script)を調製した。

α 4-1-2Blue scriptを、制限酵素Not Iで消化後T4DNAポリメラーゼ処理にて平滑末端としたのち、制限酵素EcoR Iで消化し、小DNA断片を調製した。 α 4-3Blue scriptは、制限酵素EcoR IおよびBamH Iで消化して、小DNA断片を精製した。次に、この2つの小DNA断片を、IgG S R α を制限酵素EcoR VおよびBamH Iで消化して得られる大DNA断片に同時に連結し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリン α 4·IgG重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号1に示す。以下、該プラスミド(インテグリン α 4·IgG S R α)を、インテグリン α 4·IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例3

インテグリン β 1·IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン β 1発現細胞として、ヒト繊維芽細胞株MRC5 (ATCC CCL 171)のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムを用いてPolyA (+) RNAを精製した。これをもとに逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。プライマーとして、配列情報(Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987))に従い、C端を暗号化する側にBamH I制限サイト(配列番号15)を挿入して配列番号:14および15の2本のDNAオリゴマーを合成した。

5' - GCGGAAAAGATGAATTACAAAC-3'

(配列番号 14)

5' - GTGGGATCCTCTGGACCAGTGGACAC-3'

(配列番号 15)

錆型 cDNA、プライマー、dNTPs、Taq ポリメラーゼを PCR 緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA 変性を 94 °C で 1 分、プライマーのアニーリングを 57 °C で 2 分、プライマーの伸長を 72 °C で 3 分を 30 サイクル行った。増幅したDNAを、T4DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素BamH Iで消化後DNA断片を精製した。次に、pBluescript KS (+) のSma I およびBamH Iサイトに、先のPCRで得たDNA断片をサブクローニングした。さらにこれを、制限酵素EcoR IおよびBamH Iで消化して精製した小DNA断片を、制限酵素EcoR IおよびBamH I処理した IgG:SRαの大DNA断片に挿入し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号 2 に示す。以下該プラスミド（インテグリンβ1・IgG SRα）をインテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例 4

インテグリンα4・IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

インテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ発現ベクターであるインテグリンβ1・IgG SRαと pSV2dhfr (BRL) を 10 : 1 の割合で混合し、これとリポフェクチン試薬 (GIBCO BRL) を緩やかに混合して室温 15 分間静置後、ジヒドロ葉酸リダクターゼ欠損 CHO 細胞 (ATCC CRL 9096) に滴下した。滴下 18 時間後に培養培地 (10% FBS (GIBCO)、核酸含有 αMEM 培地 (GIBCO BRL)) に交換して約 2 日間培養したのち、トリプシン-EDTA 处理にて細胞を分散し、第一選択培地 (10% FBS 含有核酸不含 αMEM 培地 (GIBCO BRL)) に懸濁して、96 ウェルプレート (CORNING) 中に播種して約 10 日間選択培養した。その後、培養上清中に産生されるインテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ蛋白質量を ELISA 法（後述）により測定し、最も高い産生量を示すクローンを、限界希釀法によるクローニングにより安定化した。

次に、安定化したインテグリンβ1・IgG 重鎖キメラ蛋白質産生 CHO 細胞

に、上記と同様のリポフェクチン法によりインテグリン $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。すなわち、インテグリン $\alpha 4 \cdot 1\text{gGSR}\alpha$ とpSV2neo(BRL)を10:1で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下18時間後に先の第一選択培地に交換して約2日間培養した後、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第二選択培地(10%FBS(GIBCO)、1mg/ml neomycin(GIBCO)を含有する核酸不含αMEM培地(GIBCO BRL))に懸濁し、96ウェルプレート(CORNING)にて耐性細胞を約10日間選択培養した。培養上清中に產生されるインテグリン $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、両キメラ蛋白質の產生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を產生するクローンとして安定化した。

実施例 5

ELISA法によるインテグリン $\alpha 4 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質產生量の測定

抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体(Becton & Dickinson、クローンL25.3)、または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(Coulter、クローン4B4)2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を96ウェルイムノプレート(NUNC)に50 $\mu\text{l}/\text{ウェル}ずついれ、4°C、16時間静置した。その後、各ウェルをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(日本製薬、Caイオン、Mgイオン不含、以下PBS(-))にて2回洗浄し、25%ブロックエース(雪印乳業)含有PBS(-)にて非特異反応をブロックした。ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、0.02%Tween含有PBS(-)(以下T-PBS)で2回洗浄した。次にビオチン化抗ヒトIgG抗体(Vector)と1時間反応後、T-PBSで2回洗浄し、続いてアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Sigma)と1時間反応後、PBS(-)で2回洗浄した。PBS(-)を完全に吸引したのち、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダー(Bio-rad NOVAPATH)を用いて490nmの吸光度を測定し、高い吸光度を$

示すクローンを選択した。

実施例 6

α 4 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製

(1) CHO 細胞の培養と培養上清の調製

α 4 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高産生する CHO 細胞を、 5 % F B S (Ultra-low Ig G グレード、 G I B C O) を含む核酸不含 α M E M 培地 (以下 α M E M (-) 培地、 G I B C O B R L) で 1 日培養し、 セミコンフルエントとなった細胞を 1 % F B S (Ultra-low Ig G グレード) を含む α M E M (-) 培地に交換して 3 日間培養したのち、 培養上清を回収した。これを P r e p - s c a l e (M i l l i p o r e) を用いた限外濾過により 1 / 10 容量まで濃縮し、 最終濃度 5 m M となるように 1 M H e p e s 溶液 (p H 8. 0) を加えて精製原液とした。

(2) プロテイン A カラムクロマトグラフィー

精製原液を、 P r o s e p G u a r d 担体 (b i o P R O C E S S I N G) カラムに通過させたのち、 P r o s e p A 担体 (b i o P R O C E S S I N G) カラムにアプライした。アプライ終了後、 カラム体積の 10 倍容量の P B S (-) で洗浄し、 続いて 0. 1 M クエン酸緩衝液 p H 6 ~ 3 のグラジエントで蛋白質を溶出した。 p H 3 で溶出されるピーク画分を回収、 1 M T r i s - H C l 溶液 (p H 8. 5) を 0. 1 容量加えて中和後、 P B S (-) に対して透析した。

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

F M P 活性化セルロファイン (生化学工業) をカップリング緩衝液 (50 m M Na₂CO₃-NaHCO₃ p H 8.5) で平衡化したのち、 ペプチド合成機で合成した配列番号 3 に示すペプチド (以下 C S - 1 ペプチド) を加え、 4 °C 、 16 時間転倒混和した。

Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr (配列番号 3)

混和後、 カップリング緩衝液で洗浄し、 ブロッキング緩衝液 (0.1 m M monoethanolamine 、 50 m M Tris-HCl p H 8.0) を加えてさらに室温で 6 時間転倒混和した。その後、 T B S 溶液 (150 m M NaCl、 20 m M Tris-HCl、 1 m M MnCl₂ 、 p H 7.5) で十分に洗浄して C S - 1 ペプチド結合セルロファインカラムを作製した。このカラムに、 精製原液をアプライして室温で 3 時間静置したのち、 カラム体積の 10 倍容量の洗浄緩衝液 (1 M NaCl、 0.1 % Triton、 20 m M Tris-HCl、 1 m M MnCl₂ p

pH 7.5) と同容量のTBS溶液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液 (10 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5) を用いてCS-1カラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、PBS (-) に対して透析した。

(4) SDS-PAGE

(3) の溶出画分を6.0または7.0%アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下でSDS-PAGEを行ったのち、ゲルをクマシーカラーリングした。その結果、非還元下では、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とその多量体と考えられる2本のバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン α 4・IgG重鎖キメラ蛋白質とインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質と考えられる2本のバンド (170 kDa、135 kDa) およびインテグリン α 4・IgG重鎖キメラ蛋白質の分子内切断 (Hemler, M. E. et al. J. Biol. Chem. 262, 11478-11485 (1987)) に由来すると考えられる2本のバンド (80 kDa、90 kDa) が認められた。これらの結果は、(3) の溶出蛋白質が、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造を有しており、しかもヘテロダイマーを構成する分子どうしがIgG重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

実施例7

α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

(1) 抗インテグリン抗体を用いる免疫沈降と陽イオンキレート剤の影響

基本的な方法は成書 ("Antibodies" Harlow E. et al. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従った。すなわち、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる実施例6(3)の溶出蛋白質をlactoperoxidase法を用いて¹²⁵Iラベル化した。次に、Affigel 1-10 (Biorad) を0.1M HEPES溶液 (pH 8.0) にて洗浄したのち、正常マウスIgG、抗ヒトインテグリン α 4抗体 (クローン11C2B) および抗ヒトイントグリン β 1抗体 (クローン4B4) を加えて4°Cで16時間反応させて共有結合させ、正常マウスIgGビーズ、および各抗体ビーズを作製した。次に、¹²⁵I標識 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白

質ヘテロダイマー複合体を、正常マウス I g G ビーズと 4 °C、4 時間転倒混和してプレクリアーブリーフしたのち、抗体ビーズと 4 °C、16 時間転倒混和した。混和後、ビーズを洗浄緩衝液 (200 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、0.1 % NP-40、1 mM MgCl₂ または 10 mM EDTA pH 8.0) にて 3 回洗浄した。洗浄後、ビーズに電気泳動用サンプルバッファーを加えて 100 °C で 5 分間処理し、遠心分離した後の上清を還元下で電気泳動した。泳動後、ゲルドライヤーにてゲルを乾燥させ、蛋白質をオートラジオグラフィーにて検出した。

1 mM MgCl₂ 存在下における免疫沈降の結果、抗ヒトインテグリン α 4 抗体と抗ヒトインテグリン β 1 抗体の両ビーズから、 α 4 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。これにより、実施例 6 の (3) で得られた蛋白質が α 4 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを同定した。

一方、10 mM EDTA 存在下での抗インテグリン β 1 抗体ビーズを用いた免疫沈降のパターンは、1 mM MgCl₂ 存在下と同様であり、インテグリン α 4 · I g G 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質との会合が、陽イオン依存性ではないことを明らかにした。以上の結果は、実施例 6 (3) で得た溶出蛋白が確かに α 4 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例 6 (4) の結果とあわせて、両蛋白質の会合が I g G 重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

(2) α 4 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のシーケンシャル免疫沈降による構造的安定性の検討

(1) に従って ¹²⁵I 標識 α 4 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と、正常マウス I g G ビーズ、抗ヒトインテグリン α 4 抗体 (11C2B) ビーズ、抗ヒトインテグリン β 1 抗体 (4B4) ビーズを、4 °C、4 時間反応させた後に洗浄した。洗浄後、2 % SDS 存在下で 100 °C、5 分間煮沸し、遠心分離した後の上清 (第 1 次免疫沈降サンプル) を 1 % BSA 含有 PBS で 10 倍希釈し、再度抗インテグリン β 1 抗体、抗インテグリン α 4 抗体ビーズと 4 °C、16 時間反応させた。反応後ビーズを洗浄し、電気泳動用サンプル

バッファーを加え、100°C、5分間処理し、遠心分離した後の上清（第2次免疫沈降サンプル）を、SDS-PAGE／オートラジオグラフィーを行った。

その結果、第1次免疫沈降により得られた電気泳動パターンは、第2次免疫沈降においても同様に認められた。この結果は、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体における α 4・IgG重鎖キメラ蛋白質と β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質の会合が、2% SDS存在下での煮沸においても解離しないことを示しており、ジスルフィド結合による安定なヘテロダイマー構造であることを強く支持するものである。

実施例 8

α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のVCAM-1への結合

CHO細胞から產生される α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、インテグリン α 4 β 1のリガンドに対し、結合能を有することをVCAM-1を発現する細胞への結合能で調べた。ヒトの正常さい帯静脈血管内皮細胞を1L-13U/m²で16時間培養してVCAM-1発現細胞を調製した。この細胞を、1mMEDTAで37°C、15分間処理して単一細胞に分散した。この細胞をサンプルチューブあたり 2×10^5 個に対し、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を產生するCHO細胞の培養上清と、最終濃度1mM MnCl₂または3mMEDTA存在下で30分間反応させた。反応後、結合測定用緩衝液（24mM Tris-HCl、10mM Hepes、150mM NaCl、1mM MnCl₂または1mM EDTA、1% BSA、2mM Glucose pH 7.4）を用いて1200rpmで室温、5分間の遠心分離により2回洗浄した。洗浄後、FITC標識抗ヒトIgG抗体（Cappel）を加え、室温で20分間反応後、同緩衝液で細胞を洗浄し、フローサイトメーター（ELITE、Coulter）にて測定した。

結果を図1に示す。 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清とVCAM-1発現細胞を反応させることにより、 α 4・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合を示す蛍光強度の増加が認められた。この結合は抗ヒトイントグリン抗体（抗 α 4抗体：クローンL25.3、10 μ g/m²+抗 β 1抗体：クローン4B4、

10 μ g / ml)、および3 mM EDTAの添加により阻害された。この結果は、 α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面に存在するインテグリン α 4 β 1と同様にVCAM-1に対する結合能をもつことを示している。また、この結合が α 4 β 1特異的であること、陽イオン依存性という結合の特徴を維持していることを示す。

実施例 9

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合

次に、インテグリン α 4 β 1のもうひとつのリガンドであるフィブロネクチン上のペプチド断片（配列番号3）に対する α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合能についても検討した。

まず、前記の報告（Humphries, M. J. et al. J. Biol. Chem. 262, 6886-6892 (1987)）に従って、配列番号3のペプチド断片（CS-1ペプチド）をラビット1gG（Sigma）に結合させて、CS-1-1gGを作製した。このCS-1-1gGをPBS（-）で希釈したのち、96ウェルプレート（NUNC）に100 μ l／ウェルずつ入れ、4°C、16時間静置することによりプレートに固相化した。

静置後、PBS（-）にて2回洗浄し、80°C、10分間加熱処理により熱変性処理した1%BSA-PBS溶液を300 μ l／ウェルずつ入れて4°C、3時間処理することにより非特異反応をブロッキングした。次に、固相化したCS-1-1gGと α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清（100 μ l）を30°C、3時間反応させた。非結合 α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、0.1%BSA含有TBS緩衝液（150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl、1 mM MnCl₂ pH 7.4）で2回洗浄除去し、結合した α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、1次抗体としてビオチン標識抗ヒト1gG抗体（Vector）、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（Sigma）と結合させた後、TBS緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後490 nmで吸光度を測定した。

その結果を図2に示す。 α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質へ

テロダイマー複合体と反応させることにより、CS-1ペプチドへの結合を示す吸光度の上昇がみられたが、この結合は、抗インテグリン α 4抗体（クローンL25.3）、抗インテグリン β 1抗体（クローン4B4）、5mMEDTAの存在下でほぼ完全に阻害された。従って、 α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体が、フィブロネクチン上のペプチド断片であるCS-1ペプチドに対しても結合能を有すること、陽イオン依存性という結合の特徴が維持されていることが明らかとなった。

実施例10

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する α 4・1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体の結合測定系を利用した阻害ペプチドの評価

実施例9の結合測定系において配列番号16（以下GPEILDVPST）、17（以下GPEILEVPST）、18（以下GRGDSP）の3種のペプチドの効果を検討した。

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr (配列番号16)

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr (配列番号17)

Gly Arg Gly Asp Ser Pro (配列番号18)

各々のペプチドはペプチド合成機で合成した。各ペプチドと α 4 1gG重鎖- β 1・1gG重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体を含むCHO培養上清100 μ lを室温で20分間混合した後、実施例9の方法に従ってCS-1-1gGへの結合を測定した。その結果を図3に示す。GPEILDVPSTは、0.1~10 μ g/mIにおいて濃度依存的な阻害活性を示したが、GPEILEVPST、GRGDSPによる結合阻害は認められなかった。この結果は、実施例9の結合測定系が、インテグリン α 4 β 1とCS-1ペプチドとの結合を阻害するペプチド（GPEILDVPST）の効果を特異的に検出できる系であることを示している。

実施例11

インテグリン α 2・1gG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン α 2の細胞外部分を暗号化するDNA断片は、既報のcDNA配列情報（Takada, Y. et al. J. Cell. Biol. 109, 397-407 (1989)）をもとに、 α 2-1と α 2-2に分割してサブクローンングし、発現ベクター上で1本化した。まず、インテグリン α 2発現細胞であるヒト線維芽細胞株MRC-5（AT

CC CCL 171) の RNA を分離し、オリゴ d T セルロースカラムを用いて Poly A (+) RNA を精製した。これをもとに 1 本鎖 c DNA を合成し、PCR の録型として使用した。PCR プライマーとして、 α 2-1 は配列番号 20 と 21、 α 2-2 は配列番号 22 と 23 の DNA オリゴマーを合成して使用した。

5' -GCTCGAGCAAACCCAGCGCAACTACGG-3' (配列番号 20)
 5' -ATAGTGCCCTGATGACCATTG-3' (配列番号 21)
 5' -GATGGCTTTAATGATGTGATTG-3' (配列番号 22)
 5' -TGTGGTACTTCGGCTTC-3' (配列番号 23)

録型 c DNA とプライマー、d NTPs、Taq ポリメラーゼを PCR 緩衝液中で混合後、サーマルサイクラーにて、PCR (反応条件：94 °C 1 分 - 60 °C 2 分 - 72 °C 3 分) を 30 サイクル行った。増幅した α 2-1 の DNA 断片は、制限酵素 Xho I および EcoR I で消化して精製し、 α 2-2 の DNA 断片は T4 DNA ポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素 EcoR I で消化して精製した。精製した 2 つの DNA 断片をリン酸化反応液 (50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、25 mM DTT、1 mM ATP、0.1 U/μl T4 ポリヌクレオチドギナーゼ (Takara) pH 8.0) 中で 37 °C、1 時間反応後、68 °C、5 分間熱処理して酵素を失活させた。次に、実施例 1 で作製した 1 g GS R α を制限酵素 Bam H I で消化後、Klenow 反応液 (66 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.2 mM dNTPs、0.05 U/μl Klenow fragment (Takara) pH 7.5) 中で 37 °C、30 分間反応させて末端を平滑化し、70 °C、5 分間熱処理して酵素を失活させた。さらに制限酵素 Xho I で消化し、大 DNA 断片を精製した。この大 DNA 断片に、先にリン酸化した 2 つ (α 2-1、 α 2-2) の DNA 断片を挿入し、プラスミド DNA を得た。得られたインテグリン α 2・1 g G 重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号 19 に示す。以下該プラスミド (インテグリン α 2・1 g G S R α) をインテグリン α 2・1 g G 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例 1 2

インテグリン α 2・1 g G 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン β 1・1 g G 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

実施例4で作製し、安定化したインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質產生CHO細胞に、実施例4と同様のリポフェクチン法によりインテグリン α 2・IgG重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。すなわち、インテグリン α 2・IgGSR α とpSV2neo(BRL)を10:1で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下18時間後に第一選択培地に交換して約2日間培養した後、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第二選択培地に懸濁し、96ウェルプレートに播種して耐性細胞を約10日間選択培養した。その後、培養上清中に產生されるインテグリン α 2・IgG重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、両キメラ蛋白質の產生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を產生するクローンとして安定化した。

実施例13

ELISA法によるインテグリン α 2・IgG重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質產生量の測定

抗ヒトイントグリン α 2抗体(Becton&Dickinson、クローンP1E6)、または抗ヒトイントグリン β 1抗体(クローン4B4)2 μ g/mLを96ウェルイムノプレートに50 μ l/ウェルずついれ、4°C、16時間静置した。その後、各ウェルをPBS(-)にて2回洗浄し、ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、T-PBSで2回洗浄し、ビオチン化抗ヒトIgG抗体と1時間、アビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼと1時間反応後、PBS(-)で2回洗浄した。洗浄後、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて490nmの吸光度を測定し、高い吸光度を示すクローンを選択した。

実施例14

α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製
(1) CHO細胞の培養と培養上清の調製

α 2・IgG重鎖- β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高

產生する C H O 細胞を、 5 % F B S (U l t r a - l o w I g G グレード) を含む α M E M (-) 培地で 1 日培養し、 セミコンフルエントとなった細胞を 1 % F B S (U l t r a - l o w I g G グレード) を含む α M E M (-) 培地に交換して 3 日間培養したのち、 培養上清を回収した。これを限外濾過により 1 / 10 容量まで濃縮し、 最終濃度 5 mM となるように 1 M H e p e s 溶液 (p H 8. 0) を加えて精製原液とした。

(2) プロテイン A カラムクロマトグラフィー

精製原液を、 P r o s e p G u a r d 担体カラムを通過させたのち、 P r o s e p A 担体カラムにアプライした。アプライ終了後、 カラム体積の 10 倍容量の P B S (-) で洗浄し、 続いて 0. 1 M クエン酸緩衝液 p H 6 ~ 3 のグラジエントで蛋白質を溶出した。 p H 3 で溶出されるピーク画分を回収、 1 M T r i s - H C l 溶液 (p H 8. 5) を 0. 1 容量加えて中和後、 P B S (-) に対して透析した。

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

報告 (Kirchhofer, D. et al. J. Biol. Chem. 265, 615-618 (1990)) に従ってコラーゲン (T y p e I 、 S i g m a) を cyanogen-bromide-activated sepharose (S i g m a) にカップリングさせたコラーゲン固定化カラムを作製した。 次に、 精製原液を T B S 緩衝液 (150 mM NaCl 、 50 mM Tris-HCl 、 1 mM MgCl₂ 、 1 mM MnCl₂ p H 7. 5) に平衡化したのち、 カラムにアプライして室温で 3 時間静置したのち、 カラム体積の 10 倍容量の洗浄緩衝液 (150 mM NaCl 、 50 mM Tris - HCl 、 1 mM MgCl₂ 、 1 mM MnCl₂ 、 100 mM Octyl glucopyranoside p H 7. 5) で洗浄した。洗浄後、 溶出緩衝液 (20 mM EDTA 、 150 mM NaCl 、 50 mM Tris-HCl 、 50 mM Octyl glucopyranoside p H 7. 5) を用いてカラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、 P B S (-) に対して透析した。

(4) S D S - P A G E

(3) の溶出画分を 7. 0 % アクリルアミドゲルを用い、 非還元下または還元下で S D S - P A G E を行ったのち、 ゲルをクマシ染色した。その結果、 非還元下では、 α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられるバンドが認められた。また、 還元下では、 インテグリン α 2 · I g G 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質と考えら

れる2本のバンド（185 kDa、135 kDa）が認められた。これらの結果は、溶出蛋白質が、 $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造であり、しかも 1gG 重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

実施例 1 5

$\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

実施例 1 4（3）の溶出蛋白質を ^{125}I ラベル化し、実施例 7 と同様に正常マウス 1gG 、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体（クローン P 1 E 6）および抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン 4 B 4）ビーズを用いて免疫沈降を行い、還元下での SDS-PAGE／オートラジオグラフィーした。

その結果、 1mM MgCl_2 または 10mMEDTA のいずれにおいても、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体の両ビーズから、 $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。この結果は、実施例 1 4（3）で得た溶出蛋白が確かに $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例 1 4（4）の結果とあわせて、両蛋白質の会合が 1gG 重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

実施例 1 6

コラーゲンに対する $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性と特異性の検討

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ のリガンドであるコラーゲンに対する $\alpha 2 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1\text{gG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性について検討した。

まず、コラーゲン（Cell matrix Type I 3 mg/ml）を 0.02M 酢酸溶液で $0.1\mu\text{g/ml}$ となるように希釈し、イムノプレートに $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ いれて 4°C 、16時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS（-）で2回洗浄して中和し、熱変性 $1\% \text{BSA-PBS}$ 溶液を $300\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 入れ、室温で3時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS（-）で2

度リソスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

α 2 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清 (100 μ l) を30°C、3時間反応させた。反応後、実施例9と同様に、 α 2 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量を測定した。

その結果、図4に示すように、 α 2 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とコラーゲンの結合を示す吸光度の上昇が認められた。この結合は、各10 μ g / mlの抗インテグリン α 2抗体（クローンP1E6）と抗インテグリン β 1抗体（クローン4B4）の共存下、および5 mM EDTAの存在下でほぼ完全に阻害された。この結果は、 α 2 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面に存在するインテグリン α 2 β 1と同様にコラーゲンに対する結合性をもつことを示している。また、この結合が α 2 β 1特異的であること、陽イオン依存性という結合の特徴を維持していることを示す。

実施例17

α 4 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体への結合性ペプチドの取得とその阻害活性の評価

まず、実施例6において精製した α 4 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体、またはヒトIg GをPBS (-)にて適当な濃度に調製し、それぞれ4°C、16時間静置してプラスチックシャーレに固相化した。次に、報告 (Scott, J. K. and Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990)) に従って、ランダムなアミノ酸6残基の両端をシステインのジスルフィド結合で環化させたファージペプチドライブラーを作製し、0.1% BSA含有TBS緩衝液に懸濁した。このファージペプチドライブラーを、ヒトIg Gと30°C、3時間反応させてIg Gに結合性をもつファージペプチドを吸収し、次に α 4 · Ig G 重鎖 - β 1 · Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と30°C、3時間反応させたのち、0.1% BSA含有TBS緩衝液により2回洗浄してヘテロダイマー複合体に非結合性のファージペプチドを除去し、結合性のファージペプチドのみを0.1Mグリシン-塩酸(pH 2.2)にて溶出後回収した。回収後、このファージを増幅し、前述の結合操作をさらに2回繰り返してヘテロダイ

マー複合体に結合性のファージペプチドのみを選択的に濃縮した。最終の溶出操作では、ヘテロダイマー複合体に結合性のファージペプチドを、10 mM EDTA または 0.1 M グリシン-塩酸を用いて 2 段階で溶出後、各ペプチドのアミノ酸配列を解析した。そのうち、8 つの配列（配列番号 24～31）を表 1 に示した。さらに、実施例 9 の結合測定系にて検討し、結合阻害活性を示した 4 つのペプチド配列の IC50 値を表 1 に示した。

表 1

溶出条件	配列	阻害活性	配列番号
		IC50 (μM)	
EDTA	Cys* Ile Pro Glu Leu Ile Val Cys*	1.2	24
	Cys* Met Arg Tyr Thr Ser Ala Cys*	2.3	25
	Cys* Glu Trp Met Lys Arg Phe Cys*		26
	Cys* Tyr Thr Thr Arg Leu Lys Cys*		27
グリシン-塩酸	Cys* Leu Arg Tyr Ser Val Pro Cys*	1.8	28
	Cys* Ile Val Asn Arg Leu Gly Cys*		29
	Cys* Gly Leu Gln Ala Leu Pro Cys*	1.0	30
	Cys* Lys Leu Lys Gly Thr Met Cys*		31

Cys*Cys*は、ジスルフィド結合を示す

実施例 18

フィブロネクチン上のペプチド断片と α 4·1gG 重鎖- β 1·1gG 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合を阻害する低分子化合物の取得

試薬および文献の化合物をランダムにピックアップし、最終濃度 50 または 100 μg/ml となるように調製して実施例 9 の結合測定系に加えたところ、阻害活性を示す化合物を得た。得られた化合物のうち、Norethynodrel (Sigma)、D-Penicillamine (Aldrich, Weigert, W.M. et al. Angew. Chem. In

t. Ed. Eng. 14, 330-336 (1975))、 γ -2-Naphthyl butyric acid (Fieser, L. F. J. Am. Chem. Soc. 70, 3197-3203 (1948))、1-Adamantaneacetic acid (Aldrich) の 4 つの結合阻害活性を表 2 に示した。

表 2

化合物名	濃度 (μ g / ml)	阻害率 (%)
Norethynodrel	5 0	2 8
D-Penicillamine	5 0	5 1
γ -2-Naphthyl butyric acid	1 0 0	3 7
1-Adamantaneacetic acid	1 0 0	6 5

実施例 19

α 2 · 1 g G 重鎖 - β 1 · 1 g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの作製

Martinらの方法 (Martin, F. J. et al. Biochemistry. 20, 4229, (1981)) に従ってリポソームを作製した。まず、ジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E, Sigma) に二架橋試薬 N スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (S D P D, Sigma) を用いて活性化 S H 基を導入し、ピリジルジチオプロピオニルジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (P D P -D P P E) を作製した。この P D P -D P P E と、ジパミルトイルホスファチジルコリン (D P P C)、コレステロールを混合して脂質フィルムを調製したのち、ソニケーターにて処理し、濾過フィルターを用いて粒径の均一なリポソームを得た (P D P -D P P E リポソーム)。次に、 α 2 · 1 g G 重鎖 - β 1 · 1 g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と、陰性コントロールとして用いるヒト Ig G (Cappel) を H e p e s 緩衝液 (100 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 8.0) に溶解し、S D P D を加えて 30 分間反応させた後、反応液を P D -10 カラム (ファルマシア) にアプライし、0.1 M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (p

H5.5) で溶出した。溶出液に、ジチオスライトイールを加えて 20 分間処理後、再度 P D - 1 0 カラムにアプライし、H e p e s 緩衝液 (100mM Hepes、150mM NaCl pH8.0) で溶出し、S D P D 修飾 α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を得た。この S D P D 修飾したヘテロダイマー複合体と P D P - D P P E リポソームを室温で 24 時間反応させ、セファロース 4 B カラム (S i g m a) で分離し、ピーク分画から α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを得た。

リポソーム上の α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量は、S D S - P A G E / クマシー染色後、デンシトメーター (A T T O) により定量し、最終濃度 1 m g / m l とした。

実施例 2 0

α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのフローサイトメトリー解析

α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを 1 m M E D T A 含有 P B S (-) に分散したのち、抗ヒトインテグリン α 2 抗体 (クローン P 1 E 6) または抗ヒトインテグリン β 1 抗体 (クローン 4 B 4) と室温で 30 分間反応させた。反応後、15000 rpm で 10 分間遠心分離し、1 m M E D T A 含有 P B S (-) で洗浄後、同溶液に再度懸濁した。これに、2 次抗体として、F I T C 標識抗マウス I g G 抗体 (C a p p e l 1 0 μ g / m l) を入れて室温で 30 分間反応させた。反応後、同様に遠心分離により洗浄し、フローサイトメトリー (E L I T E、C o u l t e r) にて測定した。

その結果、両抗体に対する陽性反応を確認し、リポソーム上に α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認した。

実施例 2 1

α 2 · I g G 重鎖 - β 1 · I g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合活性

コラーゲン (Cell matrix Type I 3 m g / m l) を 0.02 M 酢酸溶液で希釈し、イムノプレートに 100 μ l / ウェル入れ、4 °C、16 時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、P B S (-) で 2 回洗浄して中和し、熱変性

1 % B S A - P B S 溶液を $300 \mu l$ / ウェル入れ、室温で 3 時間ブロッキングした。ブロッキング後、P B S (-) で 2 度リんスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

正常ヒト血漿（ジョージ・キング社）、およびフォンビルブランドファクター欠乏（シビア）血漿（ジョージ・キング社）を抗ヒト Ig G 抗体とプロテイン A により吸収処理したのち、P B S (-) に対して 24 時間透析し、含有されているクエン酸ナトリウムを除去した。使用時に、Ca イオンおよび Mg イオン濃度を血液中の生理的陽イオン濃度条件とするため、最終濃度 Ca Cl₂ を 1.2 mM、Mg Cl₂ を 0.2 mM となるように加えた。陽イオン濃度を調整したのちの正常ヒト血漿、およびフォンビルブランドファクター欠乏血漿に $\alpha 2 \cdot Ig G$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot Ig G$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームまたはヒト Ig G リポソームが 1 ~ 100 ng / ml 蛋白濃度となるように懸濁した。この懸濁液をコラーゲンコートプレートに、 $100 \mu l$ / well ずつ入れた。プレートを、プレートシェーカーを使用して 100 回転 / 分の振とう条件下、室温で 15 分間反応させた。反応後、非結合リポソームを P B 液 (1.2 mM Ca Cl₂、0.2 mM Mg Cl₂、1 % B S A 含有 P B S、pH 7.4) で洗浄除去し、1 % グルタルアルデヒド - P B S で室温で 30 分間固定した。固定後、熱変性 B S A - P B S 溶液で室温 1 時間ブロッキングした。その後、実施例 16 に従って、1 次抗体としてビオチン標識抗ヒト Ig G 抗体、2 次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと反応させた後、T B S 緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後 490 nm で吸光度を測定した。5 mM EDTA 5 mM、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体（クローン P 1 E 6、 $10 \mu g / ml$ ）と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン 4 B 4、 $10 \mu g / ml$ ）共存下の効果を検討する際は、あらかじめリポソーム懸濁液と室温で 15 分間反応させた後、コラーゲンと反応させた。

結果を図 5 および図 6 に示す。正常ヒト血漿中では、陰性コントロールとするヒト Ig G リポソームのコラーゲンへの結合は見られないが、 $\alpha 2 \cdot Ig G$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot Ig G$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合は濃度依存的に増加した。フォンビルブランドファクター欠乏血漿を用いた場合も同様に結合した。さらに、正常血漿中に $\alpha 2 \cdot Ig G$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot Ig G$

g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを $30 \text{ ng}/\text{mL}$ 加えた場合に見られるコラーゲンへの結合は、陽イオンキレート剤であるEDTAおよび抗体の添加により完全に阻害された。この結果は、生理的な陽イオン条件の血漿中において $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが血小板同様にコラーゲンに結合することを示しており、粘着血小板の代替物となりうること、コラーゲン露出部位のモニタリング試薬になりうることを強く示唆した。さらに、フォンビルブランドファクター欠乏血漿中でも同等の結合活性を示すことから、フォンビルブランド病などの凝固異常を伴う血漿中でも利用可能であることを示している。

実施例 2 2

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームによるコラーゲン被覆状態の解析

ラボテクチャンバースライド（インターメッド、8ウェル型、プラスチック製）のウェルの中央にコラーゲン溶液 $5 \mu\text{l}$ をスポットして 16 時間静置後、洗浄し、ブロッキング処理をした。次に、このスライドに、実施例 2 1 に準じて正常ヒト血漿に $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを $30 \text{ ng}/\text{mL}$ 蛋白濃度となるように懸濁し、 $200 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ入れ、同条件で反応させた。反応後、非結合リポソームを PBS 緩衝液で洗浄除去し、固定後、ブロッキング処理した。次に、1次抗体としてビオチン標識抗ヒト 1 g G 抗体、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させた後、TBS 緩衝液で洗浄した。洗浄後、ジアミノベンチジンを加えて染色し、コラーゲン上に結合した $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの被覆状態を観察した。

ヒト 1 g G リポソームでは、コラーゲンコート部の着色が認められないが、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームでは、コラーゲンコート部全体の着色が認められた。従って、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、コラーゲンコート部分のみを被覆し、粘着血小板の代替物となることを強く示唆した。

産業上の利用可能性

本発明により、インテグリンの α 鎖と β 鎖とが安定に会合したインテグリン－免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が得られた。得られたインテグリン－免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として利用可能であるばかりでなく、インテグリンとリガンドとの結合の測定、インテグリンに結合する物質やインテグリンとリガンドとの結合を阻害する物質の探索に利用できる。さらには診断薬にも利用できる。

さらに、これらのヘテロダイマー複合体、中でもインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は血小板の代替物として利用できる。また、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ －免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、血小板減少症または血小板機能異常症などに伴う出血傾向の治療・予防薬として利用できる。さらに、細胞外マトリックスの露出部位のモニタリング試薬やターゲッティング療法にも利用できる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ : 4228

配列の型：核酸

配列

GAC	AAT	CAG	TGG	TTG	GGG	GTC	ACA	CTT	TCC	AGA	CAG	CCA	CGA	GAA	AAT	432
Asp	Asn	Gln	Trp	Leu	Gly	Val	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	Pro	Gly	Glu	Asn	
90				95						100					105	
GGA	TCC	ATC	GTG	ACT	TGT	GGG	CAT	AGA	TGG	AAA	AAT	ATA	TTT	TAC	ATA	480
Gly	Ser	Ile	Val	Thr	Cys	Gly	His	Arg	Trp	Lys	Asn	Ile	Phe	Tyr	Ile	
				110					115					120		
AAG	AAT	GAA	AAT	AAG	CTC	CCC	ACT	GGT	GGT	TGC	TAT	GGA	GTG	CCC	CCT	528
Lys	Asn	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Thr	Gly	Gly	Cys	Tyr	Gly	Val	Pro	Pro	
				125				130					135			
GAT	TTA	CGA	ACA	GAA	CTG	AGT	AAA	AGA	ATA	GCT	CCG	TGT	TAT	CAA	GAT	576
Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Tyr	Gln	Asp	
				140				145					150			
TAT	GTG	AAA	AAA	TTT	GGA	GAA	AAT	TTT	GCA	TCA	TGT	CAA	GCT	GGA	ATA	624
Tyr	Val	Lys	Lys	Phe	Gly	Glu	Asn	Phe	Ala	Ser	Cys	Gln	Ala	Gly	Ile	
				155				160					165			
TCC	AGT	TTT	TAC	ACA	AAG	GAT	TTA	ATT	GTG	ATG	GGG	GCC	CCA	GGA	TCA	672
Ser	Ser	Phe	Tyr	Thr	Lys	Asp	Leu	Ile	Val	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	
				170				175					180		185	
TCT	TAC	TGG	ACT	GGC	TCT	CTT	TTT	GTC	TAC	AAT	ATA	ACT	ACA	AAT	AAA	720
Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu	Phe	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Thr	Asn	Lys	
				190				195					200			
TAC	AAG	GCT	TTT	TTA	GAC	AAA	CAA	AAT	CAA	GTA	AAA	TTT	GGA	AGT	TAT	768
Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys	Gln	Asn	Gln	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Tyr	
				205				210					215			
TTA	GGA	TAT	TCA	GTC	GGA	GCT	GGT	CAT	TTT	CGG	AGC	CAG	CAT	ACT	ACC	816
Leu	Gly	Tyr	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	His	Phe	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Thr	
				220				225					230			
GAA	GTA	GTC	GGA	GGA	GCT	CCT	CAA	CAT	GAG	CAG	ATT	GGT	AAG	GCA	TAT	864
Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Pro	Gln	His	Glu	Gln	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	
				235				240					245			

ATA	TTC	AGC	ATT	GAT	GAA	AAA	GAA	CTA	AAT	ATC	TTA	CAT	GAA	ATG	AAA	912
Ile	Phe	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys	Glu	Leu	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Met	Lys	
250				255						260				265		
GGT	AAA	AAG	CTT	GGA	TCG	TAC	TTT	GGA	GCT	TCT	GTC	TGT	GCT	GTG	GAC	960
Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Ala	Val	Asp	
			270					275				280				
CTC	AAT	GCA	GAT	GGC	TTC	TCA	GAT	CTG	CTC	GTG	GGA	GCA	CCC	ATG	CAG	1008
Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Met	Gln	
			285				290				295					
AGC	ACC	ATC	AGA	GAG	GAA	GGA	AGA	GTG	TTT	GTG	TAC	ATC	AAC	TCT	GGC	1056
Ser	Thr	Ile	Arg	Glu	Glu	Gly	Arg	Val	Phe	Val	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	
		300			305				310							
TCG	GGA	GCA	GTA	ATG	AAT	GCA	ATG	GAA	ACA	AAC	CTC	GTT	GGA	AGT	GAC	1104
Ser	Gly	Ala	Val	Met	Asn	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Ser	Asp	
		315			320				325							
AAA	TAT	GCT	GCA	AGA	TTT	GGG	GAA	TCT	ATA	GTT	AAT	CTT	GGC	GAC	ATT	1152
Lys	Tyr	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly	Glu	Ser	Ile	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile	
		330			335				340			345				
GAC	AAT	GAT	GGC	TTT	GAA	GAT	GTT	GCT	ATC	GGA	GCT	CCA	CAA	GAA	GAT	1200
Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Asp	Val	Ala	Ile	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Asp	
		350			355				360							
GAC	TTG	CAA	GGT	GCT	ATT	TAT	ATT	TAC	AAT	GGC	CGT	GCA	GAT	GGG	ATC	1248
Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Gly	Arg	Ala	Asp	Gly	Ile	
		365			370				375							
TCG	TCA	ACC	TTC	TCA	CAG	AGA	ATT	GAA	GGA	CTT	CAG	ATC	AGC	AAA	TCG	1296
Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Arg	Ile	Glu	Gly	Leu	Gln	Ile	Ser	Lys	Ser	
		380			385				390							
TTA	AGT	ATG	TTT	GGA	CAG	TCT	ATA	TCA	CGA	CAA	ATT	GAT	GCA	GAT	AAT	1344
Leu	Ser	Met	Phe	Gly	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Gln	Ile	Asp	Ala	Asp	Asn	
		395			400				405							

AAT	GGC	TAT	GTA	GAT	GTA	GCA	GTT	GGT	GCT	TTT	CGG	TCT	GAT	TCT	GCT	1392
Asn	Gly	Tyr	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	
410				415						420				425		
GTC	TTG	CTA	AGG	ACA	AGA	CCT	GTA	GTA	ATT	GTT	GAC	GCT	TCT	TTA	AGC	1440
Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Arg	Pro	Val	Val	Ile	Val	Asp	Ala	Ser	Leu	Ser	
				430						435				440		
CAC	CCT	GAG	TCA	GTA	AAT	AGA	ACG	AAA	TTT	GAC	TGT	GTT	GAA	AAT	GGA	1488
His	Pro	Glu	Ser	Val	Asn	Arg	Thr	Lys	Phe	Asp	Cys	Val	Glu	Asn	Gly	
				445						450				455		
TGG	CCT	TCT	GTG	TGC	ATA	GAT	CTA	ACA	CTT	TGT	TTC	TCA	TAT	AAG	GGC	1536
Trp	Pro	Ser	Val	Cys	Ile	Asp	Leu	Thr	Leu	Cys	Phe	Ser	Tyr	Lys	Gly	
				460						465				470		
AAG	GAA	GTT	CCA	GGT	TAC	ATT	GTT	TTG	TTT	TAT	AAC	ATG	AGT	TTG	GAT	1584
Lys	Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Ile	Val	Leu	Phe	Tyr	Asn	Met	Ser	Leu	Asp	
				475						480				485		
GTG	AAC	AGA	AAG	GCA	GAG	TCT	CCA	CCA	AGA	TTC	TAT	TTC	TCT	TCT	AAT	1632
Val	Asn	Arg	Lys	Ala	Glu	Ser	Pro	Pro	Arg	Phe	Tyr	Phe	Ser	Ser	Asn	
				490						495				500		505
GGA	ACT	TCT	GAC	GTG	ATT	ACA	GGA	AGC	ATA	CAG	GTG	TCC	AGC	AGA	GAA	1680
Gly	Thr	Ser	Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Ser	Arg	Glu	
				510						515				520		
GCT	AAC	TGT	AGA	ACA	CAT	CAA	GCA	TTT	ATG	CGG	AAA	GAT	GTG	CGG	GAC	1728
Ala	Asn	Cys	Arg	Thr	His	Gln	Ala	Phe	Met	Arg	Lys	Asp	Val	Arg	Asp	
				525						530				535		
ATC	CTC	ACC	CCA	ATT	CAG	ATT	GAA	GCT	GCT	TAC	CAC	CTT	GGT	CCT	CAT	1776
Ile	Leu	Thr	Pro	Ile	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Tyr	His	Leu	Gly	Pro	His	
				540						545				550		
GTC	ATC	AGT	AAA	CGA	AGT	ACA	GAG	GAA	TTC	CCA	CCA	CTT	CAG	CCA	ATT	1824
Val	Ile	Ser	Lys	Arg	Ser	Thr	Glu	Glu	Phe	Pro	Pro	Leu	Gln	Pro	Ile	
				555						560				565		

CTT CAG CAG AAG AAA GAA AAA GAC ATA ATG AAA AAA ACA ATA AAC TTT	1872
Leu Gln Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe	
570 575 580 585	
GCA AGG TTT TGT GCC CAT GAA AAT TGT TCT GCT GAT TTA CAG GTT TCT	1920
Ala Arg Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser	
590 595 600	
GCA AAG ATT GGG TTT TTG AAG CCC CAT GAA AAT AAA ACA TAT CTT GCT	1968
Ala Lys Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala	
605 610 615	
GTT GGG AGT ATG AAG ACA TTG ATG TTG AAT GTG TCC TTG TTT AAT GCT	2016
Val Gly Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala	
620 625 630	
GGA GAT GAT GCA TAT GAA ACG ACT CTA CAT GTC AAA CTA CCC GTG GGT	2064
Gly Asp Asp Ala Tyr Glu Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly	
635 640 645	
CTT TAT TTC ATT AAG ATT TTA GAG CTG GAA GAG AAG CAA ATA AAC TGT	2112
Leu Tyr Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys	
650 655 660 665	
GAA GTC ACA GAT AAC TCT GGC GTG GTC CAA CTT GAC TGC AGT ATT GGC	2160
Glu Val Thr Asp Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly	
670 675 680	
TAT ATA TAT GTA GAT CAT CTC TCA AGG ATA GAT ATT AGC TTT CTC CTG	2208
Tyr Ile Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu	
685 690 695	
GAT GTG AGC TCA CTC AGC AGA GCG GAA GAG GAC CTC AGT ATC ACA GTG	2256
Asp Val Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val	
700 705 710	
CAT GCT ACC TGT GAA AAT GAA GAG GAA ATG GAC AAT CTA AAG CAC AGC	2304
His Ala Thr Cys Glu Asn Glu Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser	
715 720 725	

AGA	GTG	ACT	GTA	GCA	ATA	CCT	TTA	AAA	TAT	GAG	GTT	AAG	CTG	ACT	GTT	2352	
Arg	Val	Thr	Val	Ala	Ile	Pro	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Val		
730			735							740					745		
CAT	GGG	TTT	GTA	AAC	CCA	ACT	TCA	TTT	GTG	TAT	GGA	TCA	AAT	GAT	GAA	2400	
His	Gly	Phe	Val	Asn	Pro	Thr	Ser	Phe	Val	Tyr	Gly	Ser	Asn	Asp	Glu		
			750							755					760		
AAT	GAG	CCT	GAA	ACG	TGC	ATG	GTG	GAG	AAA	ATG	AAC	TTA	ACT	TTC	CAT	2448	
Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Cys	Met	Val	Glu	Lys	Met	Asn	Leu	Thr	Phe	His		
			765							770					775		
GTT	ATC	AAC	ACT	GGC	AAT	ACT	ATG	GCT	CCC	AAT	GTT	AGT	GTG	GAA	ATA	2496	
Val	Ile	Asn	Thr	Gly	Asn	Ser	Met	Ala	Pro	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Ile		
			780							785					790		
ATG	GTA	CCA	AAT	TCT	TTT	AGC	CCC	CAA	ACT	GAT	AAG	CTG	TTC	AAC	ATT	2588	
-	Met	Val	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Pro	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	
			795			800					805						
TTG	GAT	GTC	CAG	ACT	ACT	ACT	GGA	GAA	TGC	CAC	TTT	GAA	AAT	TAT	CAA	2592	
Leu	Asp	Val	Gln	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Cys	His	Phe	Glu	Asn	Tyr	Gln		
			810			815					820					825	
AGA	GTG	TGT	GCA	TTA	GAG	CAG	CAA	AAG	AGT	GCA	ATG	CAG	ACC	TTG	AAA	2640	
Arg	Val	Cys	Ala	Leu	Glu	Gln	Gln	Lys	Ser	Ala	Met	Gln	Thr	Leu	Lys		
					830					835					840		
GGC	ATA	GTC	CGG	TTC	TTG	TCC	AAG	ACT	GAT	AAG	AGG	CTA	TTG	TAC	TGC	2688	
Gly	Ile	Val	Arg	Phe	Leu	Ser	Lys	Thr	Asp	Lys	Arg	Leu	Leu	Tyr	Cys		
					845					850					855		
ATA	AAA	GCT	GAT	CCA	CAT	TGT	TTA	AAT	TTC	TTG	TGT	AAT	TTT	GGG	AAA	2736	
Ile	Lys	Ala	Asp	Pro	His	Cys	Leu	Asn	Phe	Leu	Cys	Asn	Phe	Gly	Lys		
					860					865					870		
ATG	GAA	AGT	GGA	AAA	GAA	GCC	AGT	GTT	CAT	ATC	CAA	CTG	GAA	GGC	CGG	2784	
Met	Glu	Ser	Gly	Lys	Glu	Ala	Ser	Val	His	Ile	Gln	Leu	Glu	Gly	Arg		
					875					880					885		

CCA TCC ATT TTA GAA ATG GAT GAG ACT TCA GCA CTC AAG TTT GAA ATA	2832		
Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile			
890	895	900	905
AGA GCA ACA GGT TTT CCA GAG CCA AAT CCA AGA GTA ATT GAA CTA AAC	2880		
Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn			
910	915	920	
AAG GAT GAG AAT GTT GCG CAT GTT CTA CTG GAA GGA CTA CAT CAT CAA	2928		
Lys Asp Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln			
925	930	935	
AGA CCC AAA CGT TAT TTC ACG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC	2978		
Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr Asp Pro Glu			
940	945		
GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGGCCC	3038		
GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCG CCCCACTCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT	3098		
GGCTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA	3158		
CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCC	3218		
TGACCTAAGC CCACCCAAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC	3278		
CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC	3333		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	950		
AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAAGCCAG CCCAGGGCTC	3380		
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
955	960		
GCCCTCCAGC TCAAGGCAGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGGCCC	3440		
AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG	3493		
Ala Pro Glu Leu Leu			
	965		
GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC	3541		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
970	975	980	

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC	3589
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
985 990 995	
CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG	3637
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
1000 1005 1010 1015	
GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG	3685
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	
1020 1025 1030	
TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT	3733
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
1035 1040 1045	
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC	3781
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
1050 1055 1060	
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCC	3828
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
1065 1070	
AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC	3888
CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG	3937
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
1075 1080	
CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC	3985
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
1085 1090 1095	
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC	4033
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
1100 1105 1110 1115	

AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAT	4081
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
1120								1125							1130	
TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	4129
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
1135								1140							1145	
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	4177
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
1150							1155							1160		
CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	4225
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
1165							1170							1175		
TGA																4228

配列番号 : 2

配列の長さ : 3463

配列の型 : 核酸

配列

ATG	AAT	TTA	CAA	CCA	ATT	TTC	TGG	ATT	GGA	CTG	ATC	AGT	TCA	GTT	TGC	48
Met	Asn	Leu	Gln	Pro	Ile	Phe	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Cys	
-20					-15					-10					-5	
TGT	GTG	TTT	GCT	CAA	ACA	GAT	GAA	AAT	AGA	TGT	TTA	AAA	GCA	AAT	GCC	96
Cys	Val	Phe	Ala	Gln	Thr	Asp	Glu	Asn	Arg	Cys	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	
1								5						10		
AAA	TCA	TGT	GGA	GAA	TGT	ATA	CAA	GCA	GGG	CCA	AAT	TGT	GGG	TGG	TGC	144
Lys	Ser	Cys	Gly	Glu	Cys	Ile	Gln	Ala	Gly	Pro	Asn	Cys	Gly	Trp	Cys	
15								20						25		
ACA	AAT	TCA	ACA	TTT	TTA	CAG	GAA	GGA	ATG	CCT	ACT	TCT	GCA	CGA	TGT	192
Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Leu	Gln	Glu	Gly	Met	Pro	Thr	Ser	Ala	Arg	Cys	
30								35						40		

GAT	GAT	TTA	GAA	GCC	TTA	AAA	AAG	AAG	GGT	TGC	CCT	CCA	GAT	GAC	ATA	240
Asp	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	Cys	Pro	Pro	Asp	Asp	Ile	
45					50					55					60	
GAA	AAT	CCC	AGA	GGC	TCC	AAA	GAT	ATA	AAG	AAA	AAT	AAA	AAT	GTA	ACC	288
Glu	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Asn	Lys	Asn	Val	Thr	
					65					70					75	
AAC	CGT	AGC	AAA	GGA	ACA	GCA	GAG	AAG	CTC	AAG	CCA	GAG	GAT	ATT	CAT	336
Asn	Arg	Ser	Lys	Gly	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ile	His	
					80					85					90	
CAG	ATC	CAA	CCA	CAG	CAG	TTG	GTT	TTG	CGA	TTA	AGA	TCA	GGG	GAG	CCA	384
Gln	Ile	Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Pro	
					95					100					105	
CAG	ACA	TTT	ACA	TTA	AAA	TTC	AAG	AGA	GCT	GAA	GAC	TAT	CCC	ATT	GAC	432
Gln	Thr	Phe	Thr	Leu	Lys	Phe	Lys	Arg	Ala	Glu	Asp	Tyr	Pro	Ile	Asp	
					110					115					120	
CTC	TAC	TAC	CTT	ATG	GAC	CTG	TCT	TAT	TCA	ATG	AAA	GAC	GAT	TTG	GAG	480
Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	
					125					130					135	
AAT	GTA	AAA	AGT	CTT	GGA	ACA	GAT	CTG	ATG	AAT	GAA	ATG	AGG	AGG	ATT	528
Asn	Val	Lys	Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Leu	Met	Asn	Glu	Met	Arg	Arg	Ile	
					145					150					155	
ACT	TCG	GAC	TTC	AGA	ATT	GGA	TTT	GGC	TCA	TTT	GTG	GAA	AAG	ACT	GTG	576
Thr	Ser	Asp	Phe	Arg	Ile	Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Glu	Lys	Thr	Val	
					160					165					170	
ATG	CCT	TAC	ATT	AGC	ACA	ACA	CCA	GCT	AAG	CTC	AGG	AAC	CCT	TGC	ACA	624
Met	Pro	Tyr	Ile	Ser	Thr	Thr	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Asn	Pro	Cys	Thr	
					175					180					185	
AGT	GAA	CAG	AAC	TGC	ACC	ACC	CCA	TTT	AGC	TAC	AAA	AAT	GTG	CTC	AGT	672
Ser	Glu	Gln	Asn	Cys	Thr	Thr	Pro	Phe	Ser	Tyr	Lys	Asn	Val	Leu	Ser	
					190					195					200	

CTT	ACT	AAT	AAA	GGA	GAA	GTA	TTT	AAT	GAA	CTT	GTT	GGA	AAA	CAG	CGC	720
Leu	Thr	Asn	Lys	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Glu	Leu	Val	Gly	Lys	Gln	Arg	
205				210					215					220		
ATA	TCT	GGA	AAT	TTG	GAT	TCT	CCA	GAA	GGT	GGT	TTC	GAT	GCC	ATC	ATG	768
Ile	Ser	Gly	Asn	Leu	Asp	Ser	Pro	Glu	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	
				225					230					235		
CAA	GTT	GCA	GTT	TGT	GGA	TCA	CTG	ATT	GGC	TGG	AGG	AAT	GTT	ACA	CGG	816
Gln	Val	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	
				240					245					250		
CTG	CTG	GTG	TTT	TCC	ACA	GAT	GCC	GGG	TTT	CAC	TTT	GCT	GGA	GAT	GGG	864
Leu	Leu	Val	Phe	Ser	Thr	Asp	Ala	Gly	Phe	His	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	
				255					260					265		
AAA	CTT	GGT	GGC	ATT	GTT	TTA	CCA	AAT	GAT	GGA	CAA	TGT	CAC	CTG	GAA	912
Lys	Leu	Gly	Gly	Ile	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Gln	Cys	His	Leu	Glu	
				270					275					280		
AAT	AAT	ATG	TAC	ACA	ATG	AGC	CAT	TAT	TAT	GAT	TAT	CCT	TCT	ATT	GCT	960
Asn	Asn	Met	Tyr	Thr	Met	Ser	His	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Ser	Ile	Ala	
				285					290					295		300
CAC	CTT	GTC	CAG	AAA	CTG	AGT	GAA	AAT	AAT	ATT	CAG	ACA	ATT	TTT	GCA	1008
His	Leu	Val	Gln	Lys	Leu	Ser	Glu	Asn	Asn	Ile	Gln	Thr	Ile	Phe	Ala	
					305					310				315		
GTT	ACT	GAA	GAA	TTT	CAG	CCT	GTT	TAC	AAG	GAG	CTG	AAA	AAC	TTG	ATC	1056
Val	Thr	Glu	Glu	Phe	Gln	Pro	Val	Tyr	Lys	Glu	Leu	Lys	Asn	Leu	Ile	
				320					325					330		
CCT	AAG	TCA	GCA	GTA	GGA	ACA	TTA	TCT	GCA	AAT	TCT	AGC	AAT	GTA	ATT	1104
Pro	Lys	Ser	Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	
					335					340				345		
CAG	TTG	ATC	ATT	GAT	GCA	TAC	AAT	TCC	CTT	TCC	TCA	GAA	GTC	ATT	TTG	1152
Gln	Leu	Ile	Ile	Asp	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Leu	
				350					355					360		

GAA	AAC	GGC	AAA	TTG	TCA	GAA	GGA	GTA	ACA	ATA	AGT	TAC	AAA	TCT	TAC	1200
Glu	Asn	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Gly	Val	Thr	Ile	Ser	Tyr	Lys	Ser	Tyr	
365				370						375					380	
TGC	AAG	AAC	GGG	GTG	AAT	GGA	ACA	GGG	GAA	AAT	GGA	AGA	AAA	TGT	TCC	1248
Cys	Lys	Asn	Gly	Val	Asn	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Lys	Cys	Ser	
				385					390					395		
AAT	ATT	TCC	ATT	GGA	GAT	GAG	GTT	CAA	TTT	GAA	ATT	AGC	ATA	ACT	TCA	1296
Asn	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Glu	Val	Gln	Phe	Glu	Ile	Ser	Ile	Thr	Ser	
				400					405					410		
AAT	AAG	TGT	CCA	AAA	AAG	GAT	TCT	GAC	AGC	TTT	AAA	ATT	AGG	CCT	CTG	1344
Asn	Lys	Cys	Pro	Lys	Lys	Asp	Ser	Asp	Ser	Phe	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	
				415					420					425		
GGC	TTT	ACG	GAG	GAA	GTA	GAG	GTT	ATT	CTT	CAG	TAC	ATC	TGT	GAA	TGT	1392
Gly	Phe	Thr	Glu	Glu	Val	Glu	Val	Ile	Leu	Gln	Tyr	Ile	Cys	Glu	Cys	
				430					435					440		
GAA	TGC	CAA	AGC	GAA	GGC	ATC	CCT	GAA	AGT	CCC	AAG	TGT	CAT	GAA	GGA	1440
Glu	Cys	Gln	Ser	Glu	Gly	Ile	Pro	Glu	Ser	Pro	Lys	Cys	His	Glu	Gly	
				445					450					460		
AAT	GGG	ACA	TTT	GAG	TGT	GGC	GCG	TGC	AGG	TGC	AAT	GAA	GGG	CGT	GTT	1488
Asn	Gly	Thr	Phe	Glu	Cys	Gly	Ala	Cys	Arg	Cys	Asn	Glu	Gly	Arg	Val	
				465					470					475		
GGT	AGA	CAT	TGT	GAA	TGC	AGC	ACA	GAT	GAA	GTT	AAC	AGT	GAA	GAC	ATG	1536
Gly	Arg	His	Cys	Glu	Cys	Ser	Thr	Asp	Glu	Val	Asn	Ser	Glu	Asp	Met	
				480					485					490		
GAT	GCT	TAC	TGC	AGG	AAA	GAA	AAC	AGT	TCA	GAA	ATC	TGC	AGT	AAC	AAT	1584
Asp	Ala	Tyr	Cys	Arg	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	Glu	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	
				495					500					505		
GGA	GAG	TGC	GTC	TGC	GGA	CAG	TGT	GTT	TGT	AGG	AAG	AGG	GAT	AAT	ACA	1632
Gly	Glu	Cys	Val	Cys	Gly	Gln	Cys	Val	Cys	Arg	Lys	Arg	Asp	Asn	Thr	
				510					515					520		

AAT	GAA	ATT	TAT	TCT	GGC	AAA	TTC	TGC	GAG	TGT	GAT	AAT	TTC	AAC	TGT	1680
Asn	Glu	Ile	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Cys	Glu	Cys	Asp	Asn	Phe	Asn	Cys	
525							530				535				540	
GAT	AGA	TCC	AAT	GGC	TTA	ATT	TGT	GGA	GGA	AAT	GGT	GTT	TGC	AAG	TGT	1728
Asp	Arg	Ser	Asn	Gly	Leu	Ile	Cys	Gly	Gly	Asn	Gly	Val	Cys	Lys	Cys	
							545				550				555	
CGT	GTG	TGT	GAG	TGC	AAC	CCC	AAC	TAC	ACT	GGC	AGT	GCA	TGT	GAC	TGT	1776
Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Asn	Pro	Asn	Tyr	Thr	Gly	Ser	Ala	Cys	Asp	Cys	
							560				565				570	
TCT	TTG	GAT	ACT	AGT	ACT	TGT	GAA	GCC	AGC	AAC	GGA	CAG	ATC	TGC	AAT	1824
Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Cys	Glu	Ala	Ser	Asn	Gly	Gln	Ile	Cys	Asn	
							575				580				585	
GGC	CGG	GGC	ATC	TGC	GAG	TGT	GGT	GTC	TGT	AAG	TGT	ACA	GAT	CCG	AAG	1872
Gly	Arg	Gly	Ile	Cys	Glu	Cys	Gly	Val	Cys	Lys	Cys	Thr	Asp	Pro	Lys	
							590				595				600	
TTT	CAA	GGG	CAA	ACG	TGT	GAG	ATG	TGT	CAG	ACC	TGC	CTT	GGT	GTC	TGT	1920
Phe	Gln	Gly	Gln	Thr	Cys	Glu	Met	Cys	Gln	Thr	Cys	Leu	Gly	Val	Cys	
							605				610				620	
GCT	GAG	CAT	AAA	GAA	TGT	GTT	CAG	TGC	AGA	GCC	TTC	AAT	AAA	GGA	GAA	1968
Ala	Glu	His	Lys	Glu	Cys	Val	Gln	Cys	Arg	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	
							625				630				635	
AAG	AAA	GAC	ACA	TGC	ACA	CAG	GAA	TGT	TCC	TAT	TTT	AAC	ATT	ACC	AAG	2016
Lys	Lys	Asp	Thr	Cys	Thr	Gln	Glu	Cys	Ser	Tyr	Phe	Asn	Ile	Thr	Lys	
							640				645				650	
GTA	GAA	AGT	CGG	GAC	AAA	TTA	CCC	CAG	CCG	GTC	CAA	CCT	GAT	CCT	GTG	2064
Val	Glu	Ser	Arg	Asp	Lys	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Val	
							655				660				665	
TCC	CAT	TGT	AAG	GAG	AAG	GAT	GTT	GAC	GAC	TGT	TGG	TTC	TAT	TTT	ACG	2112
Ser	His	Cys	Lys	Glu	Lys	Asp	Val	Asp	Asp	Cys	Trp	Phe	Tyr	Phe	Thr	
							670				675				680	

TAT TCA GTG AAT GGG AAC AAC GAG GTC ATG GTT CAT GTT GTG GAG AAT 2160
 Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn
 685 690 695 700
 CCA GAG TGT CCC ACT GGT CCA GAG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC 2213
 Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Glu Asp Pro Glu
 705 710
 GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCC 2273
 GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCG CCCCACATCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT 2333
 GGCTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA 2393
 CAAAGGGGCA GGTGCTGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCC 2453
 TGACCTAAGC CCACCCAAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC 2513
 CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC 2568
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 715
 AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAAGCCAG CCCAGGCCTC 2615
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 720 725
 GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCC 2675
 AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG 2728
 Ala Pro Glu Leu Leu
 730
 GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC 2776
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 735 740 745
 ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC 2824
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 750 755 760
 CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GCC GTG GAG 2872
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 765 770 775

GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC ACC ACG	2920
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	
780 785 790 795	
TAC CGG CTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT	2968
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
800 805 810	
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA CCC CCC	3016
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
815 820 825	
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGC	3063
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
830 835	
AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC	3123
CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG	3172
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
840 845	
CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC	3220
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
850 855 860	
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC	3268
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
865 870 875	
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAT	3316
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
880 885 890 895	
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC	3364
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
900 905 910	

AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT	3412	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
915	920	925
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA	3460	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
930	935	940
TGA		3463

配列番号 : 3

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr		
1	5	10

配列番号 : 4

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GGCGATCCCC AGCTGCTGGA AGCAGGCTCA G	31
------------------------------------	----

配列番号 : 5

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGACG GCCGTCGCAC TCATTTA

27

配列番号：6

配列の長さ：73

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTAGACCACC ATGTTCCCCA CCGAGAGCGC ATGGCTTGGG AAGCGAGGCG CGAACCCGGG
CCCCGGAGCT GCA

73

配列番号：7

配列の長さ：65

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTTCGGGGC CCGGGTTCGC GCCTCGCTTC CCAAGCCATG CGCTCTCGGT GGGGAACATG
GTGGT

65

配列番号：8

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCCGGGAGA CGGTGATGCT GTTGCTGTGC CTGGGGGTCC CGACCGGCAG G

51

配列番号：9

配列の長さ：55

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTGCCGGTC GGGACCCCCA GGCACAGCAA CAGCATCACC GTCTCCCGGA GTCGA

55

配列番号：10

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACTGCAGGC AGGCCTTACA ACGTGGACAC TGAGAGC

37

配列番号：11

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAGAAACCT GTAAATCAGC AG

22

配列番号 : 12

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCATTTATGC GGAAAGATGT GC

22

配列番号 : 13

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGGGATCCGT GAAATAACGT TTGGGTCTT

29

配列番号 : 14

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GC GGAAAGA TGAAATTAC A

22

配列番号 : 15

配列の長さ : 27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGATCCT CTGGACCAGT GGGACAC

27

配列番号：16

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1

5

10

配列番号：17

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr

1

5

10

配列番号：18

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1 5

配列番号：19

配列の長さ : 4675

配列の型：核酸

配列

ATG	AGC	CTC	GGC	TTG	ATC	CTC	ACC	AGG	AAC	ATG	GGA	ACT	GGA	GGT	TTT	384
Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Asn	Met	Gly	Thr	Gly	Gly	Phe	
85		90		95												
CTC	ACA	TGT	GGT	CCT	CTG	TGG	GCA	CAG	CAA	TGT	GGG	AAT	CAG	TAT	TAC	432
Leu	Thr	Cys	Gly	Pro	Leu	Trp	Ala	Gln	Gln	Cys	Gly	Asn	Gln	Tyr	Tyr	
100		105		110		115										
ACA	ACG	GGT	GTG	TGT	TCT	GAC	ATC	AGT	CCT	GAT	TTT	CAG	CTC	TCA	GCC	480
Thr	Thr	Gly	Val	Cys	Ser	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Leu	Ser	Ala	
120		125		130												
AGC	TTC	TCA	CCT	GCA	ACT	CAG	CCC	TGC	CCT	TCC	CTC	ATA	GAT	GTT	GTG	528
Ser	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Ser	Leu	Ile	Asp	Val	Val	
135		140		145												
GTT	GTG	TGT	GAT	GAA	TCA	AAT	AGT	ATT	TAT	CCT	TGG	GAT	GCA	GTA	AAG	576
Val	Val	Cys	Asp	Glu	Ser	Asn	Ser	Ile	Tyr	Pro	Trp	Asp	Ala	Val	Lys	
150		155		160												
AAT	TTT	TTG	GAA	AAA	TTT	GTA	CAA	GGC	CTT	GAT	ATA	GGC	CCC	ACA	AAG	624
Asn	Phe	Leu	Glu	Lys	Phe	Val	Gln	Gly	Leu	Asp	Ile	Gly	Pro	Thr	Lys	
165		170		175												
ACA	CAG	GTG	GGG	TTA	ATT	CAG	TAT	GCC	AAT	AAT	CCA	AGA	GTT	GTG	TTT	672
Thr	Gln	Val	Gly	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asn	Pro	Arg	Val	Val	Phe	
180		185		190		195										
AAC	TTG	AAC	ACA	TAT	AAA	ACC	AAA	GAA	GAA	ATG	ATT	GTA	GCA	ACA	TCC	720
Asn	Leu	Asn	Thr	Tyr	Lys	Thr	Lys	Glu	Glu	Met	Ile	Val	Ala	Thr	Ser	
200		205		210												
CAG	ACA	TCC	CAA	TAT	GGT	GGG	GAC	CTC	ACA	AAC	ACA	TTC	GGA	GCA	ATT	768
Gln	Thr	Ser	Gln	Tyr	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Asn	Thr	Phe	Gly	Ala	Ile	
215		220		225												
CAA	TAT	GCA	AGA	AAA	TAT	GCC	TAT	TCA	GCA	GCT	TCT	GGT	GGG	CGA	CGA	816
Gln	Tyr	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Arg	Arg	
230		235		240												

AGT	GCT	ACG	AAA	GTA	ATG	GTA	GTT	GTA	ACT	GAC	GGT	GAA	TCA	CAT	GAT	864
Ser	Ala	Thr	Lys	Val	Met	Val	Val	Val	Thr	Asp	Gly	Glu	Ser	His	Asp	
245				250					255							
GGT	TCA	ATG	TTG	AAA	GCT	GTG	ATT	GAT	CAA	TGC	AAC	CAT	GAC	AAT	ATA	912
Gly	Ser	Met	Leu	Lys	Ala	Val	Ile	Asp	Gln	Cys	Asn	His	Asp	Asn	Ile	
260				265					270				275			
CTG	AGG	TTT	GGC	ATA	GCA	GTT	CTT	GGG	TAC	TTA	AAC	AGA	AAC	GCC	CTT	960
Leu	Arg	Phe	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Asn	Ala	Leu	
280				285					290							
GAT	ACT	AAA	AAT	TTA	ATA	AAA	GAA	ATA	AAA	GCG	ATC	GCT	AGT	ATT	CCA	1008
Asp	Thr	Lys	Asn	Leu	Ile	Lys	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Ala	Ser	Ile	Pro	
295				300					305							
ACA	GAA	AGA	TAC	TTT	TTC	AAT	GTC	TCT	GAT	GAA	GCA	GCT	CTA	CTA	GAA	1056
Thr	Glu	Arg	Tyr	Phe	Phe	Asn	Val	Ser	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	
310				315					320							
AAG	GCT	GGG	ACA	TTA	GGA	GAA	CAA	ATT	TTC	AGC	ATT	GAA	GGT	ACT	GTT	1104
Lys	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Gln	Ile	Phe	Ser	Ile	Glu	Gly	Thr	Val	
325				330					335							
CAA	GGA	GGA	GAC	AAC	TTT	CAG	ATG	GAA	ATG	TCA	CAA	GTG	GGA	TTC	AGT	1152
Gln	Gly	Gly	Asp	Asn	Phe	Gln	Met	Glu	Met	Ser	Gln	Val	Gly	Phe	Ser	
340				345					350				355			
GCA	GAT	TAC	TCT	TCT	CAA	AAT	GAT	ATT	CTG	ATG	CTG	GGT	GCA	GTG	GGA	1200
Ala	Asp	Tyr	Ser	Ser	Gln	Asn	Asp	Ile	Leu	Met	Leu	Gly	Ala	Val	Gly	
360				365					370							
GCT	TTT	GGC	TGG	AGT	GGG	ACC	ATT	GTC	CAG	AAG	ACA	TCT	CAT	GGC	CAT	1248
Ala	Phe	Gly	Trp	Ser	Gly	Thr	Ile	Val	Gln	Lys	Thr	Ser	His	Gly	His	
375				380					385							
TTG	ATC	TTT	CCT	AAA	CAA	GCC	TTT	GAC	CAA	ATT	CTG	CAG	GAC	AGA	AAT	1296
Leu	Ile	Phe	Pro	Lys	Gln	Ala	Phe	Asp	Gln	Ile	Leu	Gln	Asp	Arg	Asn	
390				395					400							

CAC	AGT	TCA	TAT	TTA	GGT	TAC	TCT	GTG	GCT	GCA	ATT	TCT	ACT	GGA	GAA	1344
His	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Gly	Glu	
405															415	
AGC	ACT	CAC	TTT	GTT	GGT	GCT	CCT	CGG	GCA	AAT	TAT	ACC	GGC	CAG	1392	
Ser	Thr	His	Phe	Val	Ala	Gly	Ala	Pro	Arg	Ala	Asn	Tyr	Thr	Gly	Gln	
420															435	
ATA	GTG	CTA	TAT	AGT	GTG	AAT	GAG	AAT	GGC	AAT	ATC	ACG	GTT	ATT	CAG	1440
Ile	Val	Leu	Tyr	Ser	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Gln	
															440	
GCT	CAC	CGA	GGT	GAC	CAG	ATT	GGC	TCC	TAT	TTT	GGT	ACT	GTG	CTG	TGT	1488
Ala	His	Arg	Gly	Asp	Gln	Ile	Gly	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Leu	Cys	
															455	
TCA	GTT	GAT	GTG	GAT	AAA	GAC	ACC	ATT	ACA	GAC	GTG	CTC	TTG	GTA	GGT	1536
Ser	Val	Asp	Val	Asp	Lys	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Leu	Val	Gly	
															470	
GCA	CCA	ATG	TAC	ATG	AGT	GAC	CTA	AAG	AAA	GAG	GAA	GGA	AGA	GTC	TAC	1584
Ala	Pro	Met	Tyr	Met	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Glu	Glu	Gly	Arg	Val	Tyr	
															485	
CTG	TTT	ACT	ATC	AAA	AAG	GGC	ATT	TTG	GGT	CAG	CAC	CAA	TTT	CTT	GAA	1632
Leu	Phe	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Gln	His	Gln	Phe	Leu	Glu	
															500	
GGC	CCC	GAG	GGC	ATT	GAA	AAC	ACT	CGA	TTT	GGT	TCA	GCA	ATT	GCA	GCT	1680
Gly	Pro	Glu	Gly	Ile	Glu	Asn	Thr	Arg	Phe	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ala	
															520	
CTT	TCA	GAC	ATC	AAC	ATG	GAT	GGC	TTT	AAT	GAT	GTG	ATT	GTT	GGT	TCA	1728
Leu	Ser	Asp	Ile	Asn	Met	Asp	Gly	Phe	Asn	Asp	Val	Ile	Val	Gly	Ser	
															535	
CCA	CTA	GAA	AAT	CAG	AAT	TCT	GGA	GCT	GTA	TAC	ATT	TAC	AAT	GGT	CAT	1776
Pro	Leu	Glu	Asn	Gln	Asn	Ser	Gly	Ala	Val	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Gly	His	
															550	
															555	
															560	

CAG	GGC	ACT	ATC	CGC	ACA	AAG	TAT	TCC	CAG	AAA	ATC	TTG	GGA	TCC	GAT	1824
Gln	Gly	Thr	Ile	Arg	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	
565			570								575					
GGA	GCC	TTT	AGG	AGC	CAT	CTC	CAG	TAC	TTT	GGG	AGG	TCC	TTG	GAT	GGC	1872
Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	His	Leu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Arg	Ser	Leu	Asp	Gly	
580			585							590				595		
TAT	GGA	GAT	TTA	AAT	GGG	GAT	TCC	ATC	ACC	GAT	GTG	TCT	ATT	GGT	GCC	1920
Tyr	Gly	Asp	Leu	Asn	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Ala	
600			605							610						
TTT	GGA	CAA	GTG	GTT	CAA	CTC	TGG	TCA	CAA	AGT	ATT	GCT	GAT	GTA	GCT	1968
Phe	Gly	Gln	Val	Val	Gln	Leu	Trp	Ser	Gln	Ser	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	
615			620							625						
ATA	GAA	GCT	TCA	TTC	ACA	CCA	GAA	AAA	ATC	ACT	TTG	GTC	AAC	AAG	AAT	2016
Ile	Glu	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Glu	Lys	Ile	Thr	Leu	Val	Asn	Lys	Asn	
630			635							640						
GCT	CAG	ATA	ATT	CTC	AAA	CTC	TGC	TTC	AGT	GCA	AAG	TTC	AGA	CCT	ACT	2064
Ala	Gln	Ile	Ile	Leu	Lys	Leu	Cys	Phe	Ser	Ala	Lys	Phe	Arg	Pro	Thr	
645			650							655						
AAG	CAA	AAC	AAT	CAA	GTG	GCC	ATT	GTA	TAT	AAC	ATC	ACA	CTT	GAT	GCA	2112
Lys	Gln	Asn	Asn	Gln	Val	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Leu	Asp	Ala	
660			665							670				675		
GAT	GGA	TTT	TCA	TCC	AGA	GTA	ACC	TCC	AGG	GGG	TTA	TTT	AAA	GAA	AAC	2160
Asp	Gly	Phe	Ser	Ser	Arg	Val	Thr	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Lys	Glu	Asn	
680			685							690						
AAT	GAA	AGG	TGC	CTG	CAG	AAG	AAT	ATG	GTA	GTA	AAT	CAA	GCA	CAG	AGT	2208
Asn	Glu	Arg	Cys	Leu	Gln	Lys	Asn	Met	Val	Val	Asn	Gln	Ala	Gln	Ser	
695			700							705						
TGC	CCC	GAG	CAC	ATC	ATT	TAT	ATA	CAG	GAG	CCC	TCT	GAT	GTT	GTC	AAC	2256
Cys	Pro	Glu	His	Ile	Ile	Tyr	Ile	Gln	Glu	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Asn	
710			715							720						

TCT	TTG	GAT	TTG	CGT	GTG	GAC	ATC	AGT	CTG	GAA	AAC	CCT	GGC	ACT	AGC	2304
Ser	Leu	Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Asn	Pro	Gly	Thr	Ser	
725			730							735						
CCT	GCC	CTT	GAA	GCC	TAT	TCT	GAG	ACT	GCC	AAG	GTC	TTC	AGT	ATT	CCT	2352
Pro	Ala	Leu	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Phe	Ser	Ile	Pro	
740			745							750				755		
TTC	CAC	AAA	GAC	TGT	GGT	GAG	GAT	GGA	CTT	TGC	ATT	TCT	GAT	CTA	GTC	2400
Phe	His	Lys	Asp	Cys	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Cys	Ile	Ser	Asp	Leu	Val	
760			765							770						
CTA	GAT	GTC	CGA	CAA	ATA	CCA	GCT	GCT	CAA	GAA	CAA	CCC	TTT	ATT	GTC	2448
Leu	Asp	Val	Arg	Gln	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Val	
775			780							785						
AGC	AAC	CAA	AAC	AAA	AGG	TTA	ACA	TTT	TCA	GTA	ACA	CTG	AAA	AAT	AAA	2496
Ser	Asn	Gln	Asn	Lys	Arg	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Asn	Lys	
790			795							800						
AGG	GAA	AGT	GCA	TAC	AAC	ACT	GGA	ATT	GTT	GTT	GAT	TTT	TCA	GAA	AAC	2544
Arg	Glu	Ser	Ala	Tyr	Asn	Thr	Gly	Ile	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Glu	Asn	
805			810							815						
TTG	TTT	TTT	GCA	TCA	TTC	TCC	CTA	CCG	GTT	GAT	GGG	ACA	GAA	GTA	ACA	2592
Leu	Phe	Phe	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Pro	Val	Asp	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	
820			825							830				835		
TGC	CAG	GTG	GCT	GCA	TCT	CAG	AAAG	TCT	GTT	GCC	TGC	GAT	GTA	GGC	TAC	2640
Cys	Gln	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Lys	Ser	Val	Ala	Cys	Asp	Val	Gly	Tyr	
840			845							850						
CCT	GCT	TTA	AAG	AGA	GAA	CAA	CAG	GTG	ACT	TTT	ACT	ATT	AAC	TTT	GAC	2688
Pro	Ala	Leu	Lys	Arg	Glu	Gln	Gln	Val	Thr	Phe	Thr	Ile	Asn	Phe	Asp	
855			860							865						
TTC	AAT	CTT	CAA	AAC	CTT	CAG	AAAT	CAG	GCG	TCT	CTC	AGT	TTC	CAA	GCC	2736
Phe	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Gln	Asn	Gln	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln	Ala	
870			875							880						

TTA	AGT	GAA	AGC	CAA	GAA	GAA	AAC	AAG	GCT	GAT	AAT	TTG	GTC	AAC	CTC	2784
Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Glu	Glu	Asn	Lys	Ala	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Leu	
885		890		895												
AAA	ATT	CCT	CTC	CTG	TAT	GAT	GCT	GAA	ATT	CAC	TTA	ACA	AGA	TCT	ACC	2832
Lys	Ile	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Glu	Ile	His	Leu	Thr	Arg	Ser	Thr	
900		905		910		915										
AAC	ATA	AAT	TTT	TAT	GAA	ATC	TCT	TCG	GAT	GGG	AAT	GTT	CCT	TCA	ATC	2880
Asn	Ile	Asn	Phe	Tyr	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Gly	Asn	Val	Pro	Ser	Ile	
920		925		930												
GTG	CAC	AGT	TTT	GAA	GAT	GTT	GGT	CCA	AAA	TTC	ATC	TTC	TCC	CTG	AAG	2928
Val	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Val	Gly	Pro	Lys	Phe	Ile	Phe	Ser	Leu	Lys	
935		940		945												
GTA	ACA	ACA	GGA	AGT	GTT	CCA	GTA	AGC	ATG	GCA	ACT	GTA	ATC	ATC	CAC	2976
Val	Thr	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Val	Ser	Met	Ala	Thr	Val	Ile	Ile	His	
950		955		960												
ATC	CCT	CAG	TAT	ACC	AAA	GAA	AAG	AAC	CCA	CTG	ATG	TAC	CTA	ACT	GGG	3024
Ile	Pro	Gln	Tyr	Thr	Lys	Glu	Lys	Asn	Pro	Leu	Met	Tyr	Leu	Thr	Gly	
965		970		975												
GTG	CAA	ACA	GAC	AAG	GCT	GGT	GAC	ATC	AGT	TGT	AAT	GCA	GAT	ATC	AAT	3072
Val	Gln	Thr	Asp	Lys	Ala	Gly	Asp	Ile	Ser	Cys	Asn	Ala	Asp	Ile	Asn	
980		985		990		995										
CCA	CTG	AAA	ATA	GGA	CAA	ACA	TCT	TCT	TCT	GTA	TCT	TTC	AAA	AGT	GAA	3120
Pro	Leu	Lys	Ile	Gly	Gln	Thr	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Ser	Glu		
1000		1005		1010												
AAT	TTC	AGG	CAC	ACC	AAA	GAA	TTG	AAC	TGC	AGA	ACT	GCT	TCC	TGT	AGT	3168
Asn	Phe	Arg	His	Thr	Lys	Glu	Leu	Asn	Cys	Arg	Thr	Ala	Ser	Cys	Ser	
1015		1020		1025												
AAT	GTT	ACC	TGC	TGG	TTG	AAA	GAC	GTT	CAC	ATG	AAA	GGA	GAA	TAC	TTT	3216
Asn	Val	Thr	Cys	Trp	Leu	Lys	Asp	Val	His	Met	Lys	Gly	Glu	Tyr	Phe	
1030		1035		1040												

GTT	AAT	GTG	ACT	ACC	AGA	ATT	TGG	AAC	GGG	ACT	TTC	GCA	TCA	TCA	ACG	3264
Val	Asn	Val	Thr	Thr	Arg	Ile	Trp	Asn	Gly	Thr	Phe	Ala	Ser	Ser	Thr	
1045															1055	
TTC	CAG	ACA	GTA	CAG	CTA	ACG	GCA	GCT	GCA	GAA	ATC	AAC	ACC	TAT	AAC	3312
Phe	Gln	Thr	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Glu	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	
1060															1075	
CCT	GAG	ATA	TAT	GTG	ATT	GAA	GAT	AAC	ACT	GTT	ACG	ATT	CCC	CTG	ATG	3360
Pro	Glu	Ile	Tyr	Val	Ile	Glu	Asp	Asn	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Leu	Met	
1080															1090	
ATA	ATG	AAA	CCT	GAT	GAG	AAA	GCC	GAA	GTA	CCA	ACA	GAT	CCC	GAG		3405
Ile	Met	Lys	Pro	Asp	Glu	Lys	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Pro	Glu		
1095															1105	
CTGCTGGAAG	CAGGCTCAGC	GCTCCTGCCT	GGACGCATCC	CGGCTATGCA	CCCCCAGTCC											3465
AGGGCAGCAA	GGCAGGGCCC	GTCTGCCCTCT	TCACCCGGAG	CCTCTGCCCG	CCCCACTCAT											3525
GCTCAGGGAG	AGGGTCTTCT	GGCTTTTCC	CAGGCTCTGG	GCAGGCACAG	GCTAGGTGCC											3585
CCTAACCCAG	GCCCTGCACA	CAAAGGGCA	GGTGCTGGGC	TCAGACCTGC	CAAGAGCCAT											3645
ATCCGGGAGG	ACCCCTGCC	TGACCTAAGC	CCACCCCAA	GGCCAAACTC	TCCACTCCCT											3705
CAGCTCGGAC	ACCTTCTCTC	CTCCCAGATT	CCAGTAACTC	CCAATCTTCT	CTCTGCA											3762
GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA		3807
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro		
1110															1120	
GCTAAGCCAG	CCCAGGCCTC	CCCCTCCAGC	TCAAGGCAGG	ACAGGTGCC	TAGAGTAGCC											3867
TGCATCCAGG	GACAGGGCCC	AGCCGGGTGC	TGACACGTCC	ACCTCCATCT	CTTCCTCA											3925
GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC	TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	3973
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
1125															1135	
CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	4021
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
1140															1150	

GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	4069
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
1155			1160							1165						
GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	4117
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
1170			1175						1180			1185				
CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGG	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	4165
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
1190							1195					1200				
CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	4213
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
1205							1210					1215				
GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA			4255
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys			
1220						1225					1230					
GGTGGGACCC	GTGGGGTGCG	AGGGCCACAT	GGACAGAGGC	CGGCTCGGCC	CACCCCTCTGC											4315
CCTGAGAGTG	ACCGCTGTAC	CAACCTCTGT	CCTACA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA							4369
CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	4417
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
1240						1245					1250					
GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	4465
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
1255						1260					1265					
GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	4513
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
1270						1275					1280			1285		

CCT CCC GTG CTG GAT TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC	4561	
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
1290	1295	1300
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC	4609	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
1305	1310	1315
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC	4657	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
1320	1325	1330
CTG TCT CCG GGT AAA TGA	4675	
Leu Ser Pro Gly Lys		
1335		

配列番号 : 20

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTCGAGCAA ACCCAGCGCA ACTACGG

27

配列番号 : 21

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATAGTGCCT GATGACCATT G

21

配列番号 : 22

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATGGCTTTA ATGATGTGAT TG

22

配列番号 : 23

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGTTGGTACT TCGGCTTTCT C

21

配列番号 : 24

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Ile Pro Glu Leu Ile Val Cys

1

5

配列番号 : 25

配列の長さ : 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Met Arg Tyr Thr Ser Ala Cys

1

5

配列番号：26

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Glu Trp Met Lys Arg Phe Cys

1

5

配列番号：27

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Tyr Thr Thr Arg Leu Lys Cys

1

5

配列番号：28

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Leu Arg Tyr Ser Val Pro Cys

1

5

配列番号 : 29

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Ile Val Asn Arg Leu Gly Cys

1

5.

配列番号 : 30

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Gly Leu Gln Ala Leu Pro Cys

1

5

配列番号 : 31

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Lys Leu Lys Gly Thr Met Cys

1

5

請求の範囲

1. インテグリンの α 鎖または β 鎖と、免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ蛋白質。
2. インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなる請求項1記載のキメラ蛋白質と、インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなる請求項1記載のキメラ蛋白質が会合してなるキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
3. 請求項1記載のキメラ蛋白質が以下の組み合わせ(1)、(2)、および(3)のいずれかで会合してなる請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
 - (1) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖 - β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
 - (2) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの軽鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖 - β 鎖・免疫グロブリン軽鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
 - (3) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの軽鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン軽鎖 - β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
4. インテグリンの α 鎖が α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α 11b、または α Eである請求項1から3のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
5. インテグリンの β 鎖が β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、または β 8である請求項1から3のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。
6. インテグリンの α 鎖が α 4または α 2であり、 β 鎖が β 1である請求項2ま

たは 3 記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

7. インテグリンの α 4 と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 1 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

8. インテグリンの α 2 と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 1 9 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

9. インテグリンの β 1 と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 2 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

10. 請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

11. インテグリンの α 鎖が α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α IIb、または α E である請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

12. インテグリンの β 鎖が β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、または β 8 である請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

13. 配列番号 1 または配列番号 1 9 の塩基配列で示される請求項 1 1 記載の DNA。

14. 配列番号 2 の塩基配列で示される請求項 1 2 記載の DNA。

15. 請求項 1 0 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

16. 請求項 1 1 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

17. 請求項 1 2 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

18. 請求項 1 3 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

19. 請求項 1 4 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

20. インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ

蛋白質を暗号化するDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクターおよびインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ蛋白質を暗号化するDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクターにより同時に形質転換された動物細胞。

21. 請求項16および請求項17記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項20記載の動物細胞。

22. 請求項18および請求項19記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項20記載の動物細胞。

23. 請求項20記載の動物細胞を培養することを特徴とする請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の製造方法。

24. 請求項1から9のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬。

25. 請求項1から9のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬組成物。

26. 単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物。

27. 細胞外マトリックスレセプターが、インテグリンである請求項26記載の血小板代替物。

28. インテグリンの α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE である請求項27記載の血小板代替物。

29. インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ である請求項27記載の血小板代替物。

30. インテグリンがインテグリン $\alpha 2\beta 1$ である請求項27記載の血小板代替物。

31. 細胞外マトリックスレセプターが、細胞外マトリックスレセプターと免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項26記載の血小板代替物。

32. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、インテグリンと免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項31記載の血小板代替物。

33. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテ

ロダイマー複合体である請求項 3 2 記載の血小板代替物。

3 4. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、請求項 6 記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項 3 3 記載の血小板代替物。

3 5. 細胞外マトリックスレセプターを担体に結合させて用いることを特徴とする請求項 2 6 から 3 4 のいずれかに記載の血小板代替物。

3 6. 止血能を有することを特徴とする請求項 2 6 から 3 5 のいずれかに記載の血小板代替物。

3 7. インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞を接触させて混合物を作製した後、リガンドまたは細胞に結合したキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量もしくはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量または細胞量を測定することを特徴とする、請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞の結合を試験する方法。

3 8. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いてインテグリンに結合する物質を探索する方法。

3 9. 請求項 3 8 記載の方法を用いて得られる、インテグリンに結合する物質。

4 0. 請求項 3 7 記載の方法を用いてインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質を探索する方法。

4 1. リガンドが配列番号 3 で示されるフィブロネクチンフラグメント、またはコラーゲンである請求項 4 0 記載の方法。

4 2. 請求項 4 0 または 4 1 記載の方法を用いて得られる、インテグリンとリガンドの結合を阻害する蛋白質、ペプチド、または低分子化合物。

4 3. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を使用することを特徴とするインテグリンのリガンドの量を測定する方法。

4 4. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を使用することを特徴とする細胞外マトリックス露出部位を同定する方法。

図面

図 1

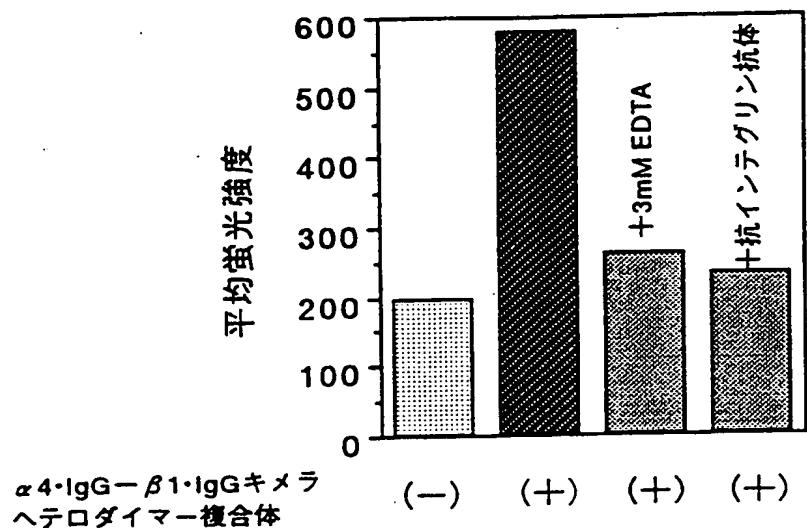
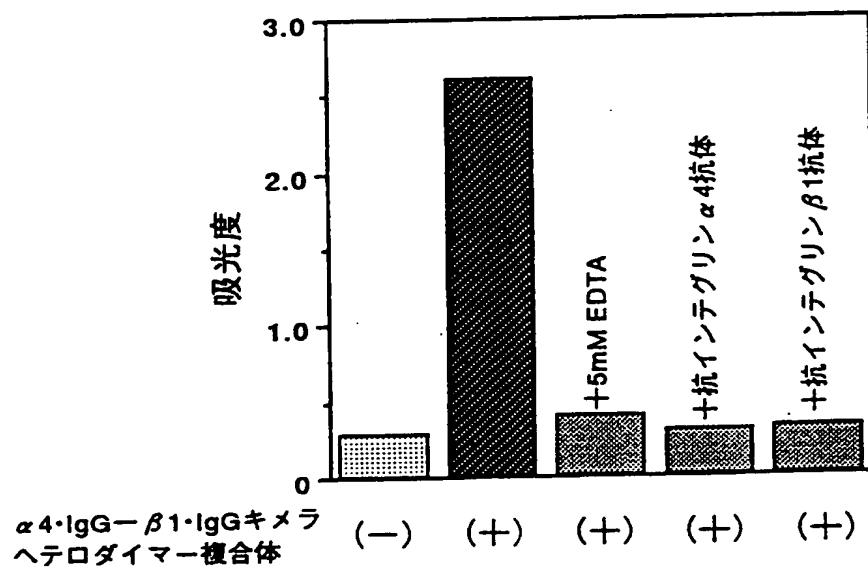


図 2



図面

図3

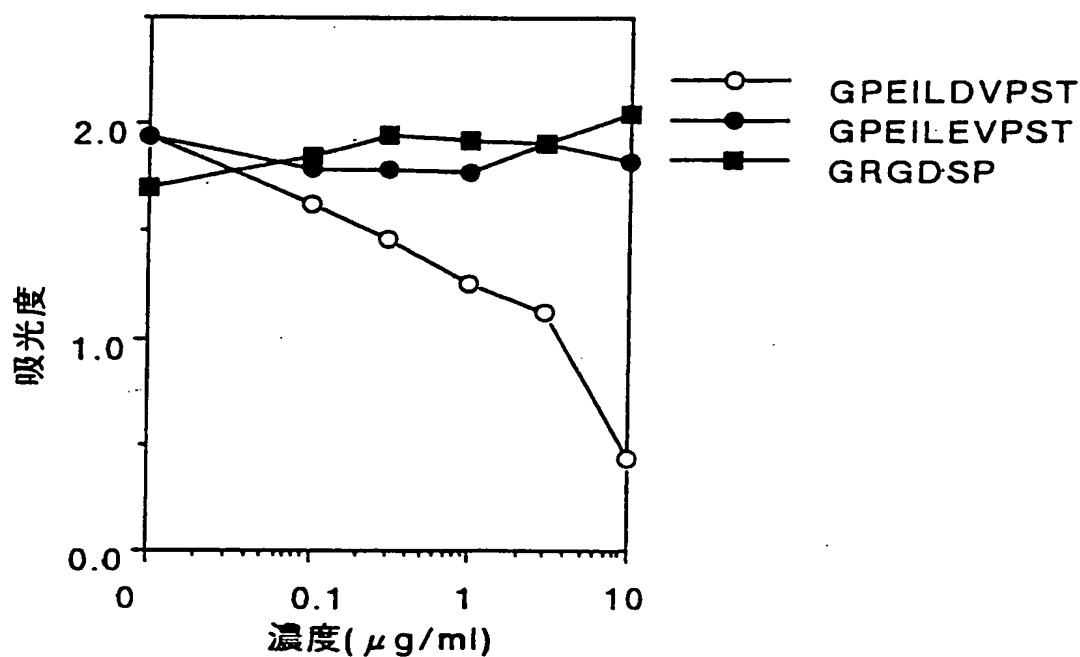
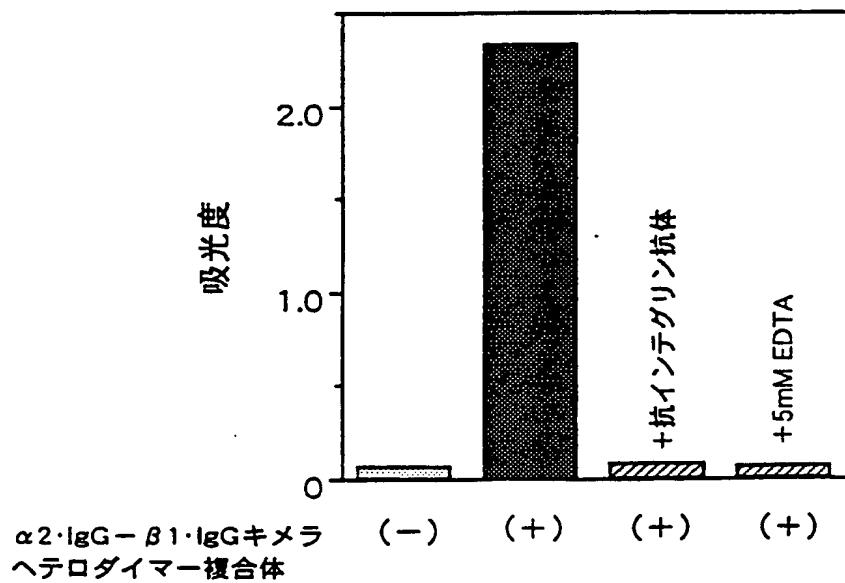


図4



図面

図 5

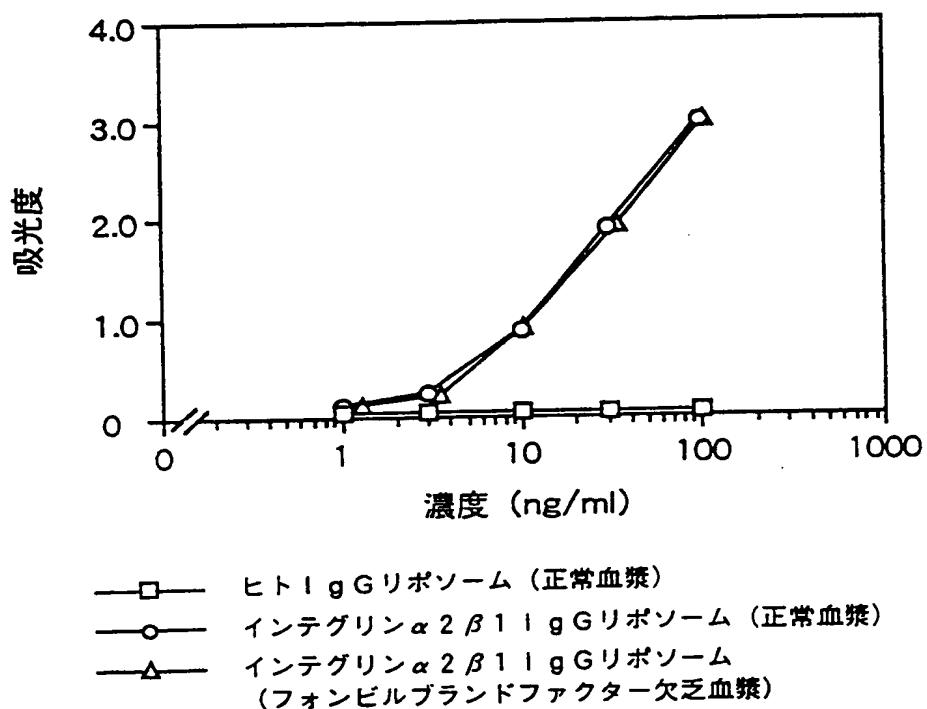
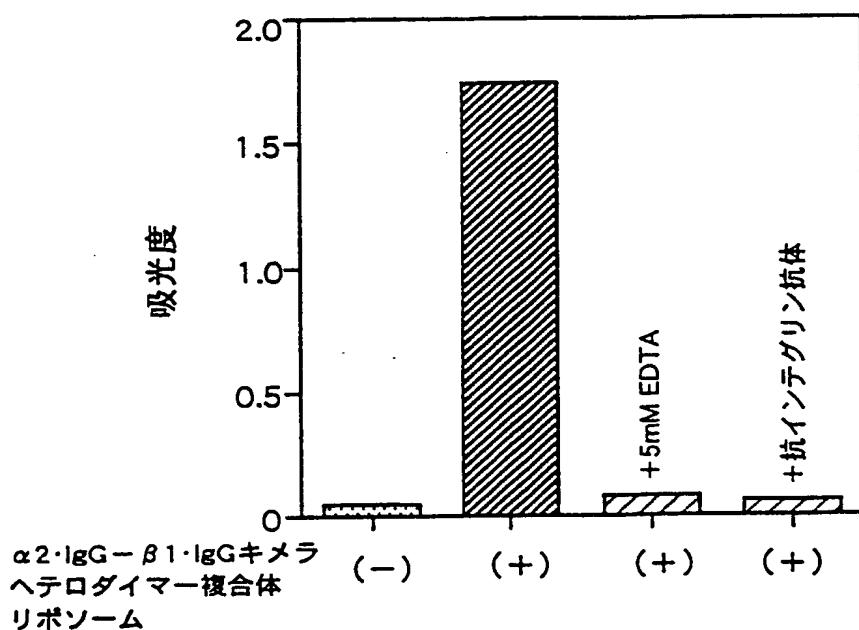


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.), August 20, 1992 (20. 08. 92) & AU, 9214385, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.), January 26, 1995 (26. 01. 95) (Family: none)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	JP, 6-87899, A (Educational Foundation Fujita Gakuen), March 29, 1994 (29. 03. 94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 13 (1982) J.W. Ellison et al., "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C _γ gene" p.4071-4079	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al., "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p.671-679	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
June 8, 1998 (08. 06. 98)Date of mailing of the international search report
June 16, 1998 (16. 06. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00370

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al., "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p.1361-1368	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M.C. Szabo et al., "Identification of two variants of the human integrin α_4 subunit", p.1453-1454	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W.S. Argraves et al., "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p.1183-1190	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	US, 5516634, A (Newman P.J.), May 14, 1996 (14. 05. 96) (Family: none)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al., "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p.397-407	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al., "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integirn subunit $\alpha 2$)", p.2427-2432	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
X/Y	JP, 7-500721, A (The Regents of the University of California), January 26, 1995 (26. 01. 95) & WO, 92/12236, A1	39/37-38, 43, 44
X/Y	JP, 5-505179, A (La Jolla Cancer Research Foundation), August 5, 1993 (05. 08. 93) & WO, 91/09874, A & EP, 507836, A & US, 5169930, A	39/37-38, 43, 44
Y	JP, 5-502228, A (Scripps Clinic & Research Foundation), April 22, 1993 (22. 04. 93) & WO, 91/07977, A & EP, 502124, A & US, 5196511, A	26-36, 42

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C07K 14/705, C12N 15/12, G01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C07K 14/705, C12N 15/12, G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DERWENT), WPI(DERWENT), GenBank/EMBL(geneseq)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.) 20.8月.1992(20.08.92) & AU, 9214385, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.) 26.1月.1995 (26.01. 95) (ファミリーなし)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	JP, 6-87899, A (学校法人藤田学園) 29.3月.1994 (29.03.94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 13 (1982) J. W. Ellison et al; "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C ₁ gene" p. 4071-4079	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたも
の
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理
論の理解のために引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.98

国際調査報告の発送日

16.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B 9452

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al. ; "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p. 671-679	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al. : "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p. 1361-1368	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M. C. Szabo et al. ; "Identification of two variants of the human integrin α_4 subunit", p. 1453-1454	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W. S. Argraves et al. ; "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p. 1183-1190	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	U.S. 5 5 1 6 6 3 4, A (Newman P. J.) 14. 5月. 1996 (14. 05. 96) (ファミリーなし)	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al. ; "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p. 397-407	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
Y	J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al. ; "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit $\alpha 2$)", p. 2427-2432	1-25, 26-34, 37-38, 40, 41
X/Y	J.P. 7-500721, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァー シティー オブ カリフォルニア) 26. 1月. 1995 (26. 01. 95) & WO, 92/12236, A 1	39/37-38, 43, 44
X/Y	J.P. 5-505179, A (ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウンデーション) 5. 8月. 1993 (05. 08. 93) & WO, 91/09874, A & EP, 507836, A & U.S. 5169930, A	39/37-38, 43, 44
Y	J.P. 5-502228, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 22. 4月. 1993 (22. 04. 93) & WO, 91/07977, A & EP, 502124, A & U.S. 5196511, A	26-36, 42